

Contribution à l'étude des Bactéries bleues et violettes

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 12 Juin 1934

DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Grade de

Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Pierre GODFRIN

Pharmacien de 1^{re} Classe

Né le 15 Mai 1891 à Nancy

Examineurs. . . {	MM. LASSEUR.	Président.
	GILLOT.	Juges.
	VERNIER.	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547420_0030

Contribution à l'étude des Bactéries bleues et violettes

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 12 Juin 1934

DEVANT LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le Grade de

Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Pierre GODFRIN

Pharmacien de 1^{re} Classe

Né le 15 Mai 1891 à Nancy

Examineurs. . . {	MM. LASSEUR.	Président.
	GILLOT.	Juges.
	VERNIER.	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1934

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, O. ✱, ☼, I ☼, O. ☼, ✱, ✱, Recteur de l'Université de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES:

MM. FAVREL, ✱, I ☼

BRUNTZ, O. ✱, ☼, I ☼, O. ☼, ✱, ✱

DOYEN:

M. SEYOT, ✱, ☼, I ☼, ☼, ✱

ASSESEUR:

M. GILLOT, I ☼, ☼

PROFESSEURS:

MM. GRÉLOT, ✱, I ☼, ☼.....	Pharmacie galénique.
DOURIS, I ☼, ☼, ✱.....	Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ☼, ✱.	Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ☼, I ☼, ☼, ✱.	Histoire naturelle.
LASSEUR, ✱, I ☼, ☼.....	Microbiologie.
GILLOT, I ☼, ☼.....	Matière médicale.
PRÉVOST, ☼.....	Chimie organique.

AGRÉGÉ LIBRE:

M. GIRARDET, ✱, I ☼..... Chimie et Toxicologie.

CHARGÉS DE COURS

MM. PRÉVOST, ☼.....	Chimie minérale et Minéralogie.
GRÉLOT, ✱, I ☼, ☼.....	Hydrologie.
PASTUREAU, O ✱, I ☼, ✱.	Chimie biologique.
DONZELOT.....	Physique.
VERNIER, I ☼.....	Zoologie.
SIMONNET, I ☼.....	Législation et Déontologie.
GILLOT, I ☼, ☼.....	Pharmacotechnie.
CORDEBARD, I ☼, ☼.....	Analyse chimique.
SEYOT, ✱, ☼, I ☼, ☼, ✱..	Hygiène.

CHEFS DE TRAVAUX:

MM. VERNIER, I ☼.....	Microbiologie et Parasitologie.
MEUNIER.....	Pharmacie.
CORDEBARD, I ☼, ☼.....	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ.....	Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux)	Physique.
DIVOUX (chargé de travaux)..	Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET, I ☼..... Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

Directeur à l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Nancy

A MA MÈRE

Modeste témoignage de notre affection filiale et de notre infinie reconnaissance.

A MA FEMME

Nous lui devons notre bonheur ; qu'elle reçoive ici l'assurance de notre inaltérable attachement.

A MON FRÈRE

L'Ami et le Collaborateur de toujours.
Témoignage d'affection et de dévouement fraternels.

A TOUTE MA FAMILLE

MEIS ET AMICIS

A MON MAITRE VÉNÉRÉ
A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR LASSEUR

qui nous a constamment porté le plus
affectueux intérêt ;

en témoignage de notre profonde reconnaissance.

A MES JUGES

M. LE PROFESSEUR GILLOT

M. LE DOCTEUR VERNIER

Le bienveillant accueil qu'ils ont réservé à cette Thèse, les marques d'amitié qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer resteront toujours présents à notre mémoire.

A MES ANCIENS MAITRES

M. LE RECTEUR L. BRUNTZ

l'élève, le collaborateur, l'Ami de notre
regretté Père.

MM. LES PROFESSEURS DE LA FACULTÉ

ET DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE NANCY

A MES ANCIENS CHEFS DE LABORATOIRE

Civils et Militaires

M. LE PROFESSEUR HOLLANDE

Professeur à la Faculté de Montpellier

M. LE PROFESSEUR SARTORY

Professeur à la Faculté de Strasbourg

M. LE DOCTEUR MAGROU

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur à Paris

M. LE DOCTEUR ORTICONI

Ancien Chef du Laboratoire de Bactériologie du XX^e Corps d'Armée

M. LE DOCTEUR SAINT-GIRONS

Chef du Laboratoire de l'Hôpital des Enfants Malades à Paris

AVANT-PROPOS

Nous étions bien jeune lorsque, pour la première fois, nous franchîmes le seuil de l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Nancy — si jeune même que notre mémoire est incapable d'en préciser le souvenir. Pendant nos études secondaires au Lycée de Nancy, notre père, alors Professeur à la dite Ecole, nous avait réservé une table dans un coin de son laboratoire, où docilement, sous son œil vigilant, nous faisons nos devoirs quotidiens. Et ce n'est pas sans une certaine intrigue mystérieuse que nous observions tous ces appareils de laboratoire, soigneusement recouverts d'une cloche de verre, ces microtomes, ces microscopes! Quelquefois les devoirs terminés, la récompense nous attendait; notre père quittant de l'œil cette « lunette », sur laquelle il avait été courbé toute la grande journée, voulait nous faire observer à notre tour, mais nous voyions sans comprendre....

Le baccalauréat passé, c'est à la Faculté des Sciences, en suivant les cours et travaux pratiques du P. C. N., que nous fîmes nos premières armes. Nous étions fier de la supériorité que nous avions sur nos camarades tout neufs, car tous les objets dont nous étions entouré, nous étaient déjà familiers, et nous n'étions même pas impressionné par la phrase que notre brave homme de Chef de Travaux répétait comme une antienne: « la main à la vis micrométrique ».

Plus tard le stage pharmaceutique devait nous faire passer deux agréables années au contact d'un pharmacien pour qui la Bactériologie était une occupation distrayante, aussi, dès notre entrée à l'Ecole Supérieure de Pharmacie comme étudiant, nous sommes nous dirigé de suite vers cette branche particulière de l'enseignement, et avons nous été agréé comme assistant bénévole au laboratoire de Microbiologie.

Voulant suivre les traces de notre père, et devenir membre de l'enseignement, nous avons résolu d'accomplir notre service militaire, aussitôt que possible. Les capacités que nous avions alors, nous ont permis d'être affecté au laboratoire de Bactériologie de la xx^e région, où pendant deux ans, nous avons travaillé d'une façon intense, mais toutefois instructive

et intéressante. Puis ce fut la guerre. La démobilisation nous toucha encore étudiant ; il fallut mettre les bouchées doubles, se hâter d'avoir son diplôme, afin de se créer une situation, nous voulons dire prendre officine.

Quelques années passèrent. Vouloir revenir à nos chères études, nous prîmes la résolution de faire un travail qui devait nous servir de thèse, pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie, et nous allâmes solliciter notre Maître, le Professeur LASSEUR, qui voulût bien nous en soumettre le sujet.

Le Professeur LASSEUR n'était pas inconnu de nous. Ses nombreux travaux nous avaient déjà intéressé. Pendant la guerre, jusqu'en 1917 les étudiants en Pharmacie ne jouissant pas des mêmes avantages que les étudiants en Médecine, appartenaient aux formations sanitaires de l'avant, sans aucun grade. En décembre de cette année, ils purent néanmoins accéder au grade de pharmacien auxiliaire, après avoir suivi des cours techniques dans des centres d'instruction, et subi un concours qui devait reconnaître leurs aptitudes. Or, nous eûmes la bonne fortune d'être affecté au centre d'instruction de Nancy, alors que notre division était en ligne devant Pont-à-Mousson. C'est à l'Ecole de Pharmacie qu'eurent lieu ces cours. Nous y retrouvâmes beaucoup de nos anciens professeurs. L'enseignement bactériologique était confié au Professeur LASSEUR. Nous nous le rappelons encore dans sa tenue bleue, derrière la « paillasse » du grand amphithéâtre. Certes, si ses galons ne brillaient pas par la quantité, ils brillaient du moins par leur largeur, il n'était que sergent!... C'est une de ces anomalies comme il en existait beaucoup, et qui ne s'expliquaient que par l'application d'un règlement souvent trop mesquin. Son cours était précis, concis, il attirait plus que l'intérêt, il nous captivait. Le sergent LASSEUR manifestait en outre à notre égard une bonhomie et une camaraderie qui nous touchaient, on eut dit qu'il voulait nous rendre ce séjour passager à l'Ecole plus agréable, pour nous faire oublier les durs moments que nous avions tous traversés, dans les formations combattantes que nous avions momentanément quittées. Tous nous lui en savions gré.

*
* *

Il est de coutume d'inaugurer un tel ouvrage, si modeste soit-il par un thème de reconnaissance.

Nous avons l'impression de ne pas nous soumettre à une tradition ba-

nale, mais bien de remplir un devoir, en adressant à tous ceux qui nous ont aidé, soit par l'enseignement qu'ils nous ont légué, soit par la collaboration qu'ils n'ont cessé de nous apporter, le témoignage de notre profonde gratitude et de notre inaltérable reconnaissance.

Rendons hommage tout d'abord à la probité morale et au grand savoir du Professeur G. THIRY de la Faculté de Médecine de Nancy. Il fut un des précurseurs dans l'étude des bactéries pigmentées, et nous avons eu l'occasion de citer de nombreuses fois son nom au cours de notre travail. Le Professeur THIRY était en outre l'ami d'un père regretté, avec qui il se livrait à l'étude approfondie des cryptogames, et qu'il assistait dans toutes ses recherches mycologiques.

Nous tenons à remercier tout particulièrement notre éminent Maître le Professeur LASSEUR. C'est à sa bienveillance et à sa patience, que nous devons de nous présenter devant un Jury de thèse dont il a bien voulu nous faire l'honneur d'être le Président. C'est à l'énorme monument de ses travaux et publications que nous devons la plus grosse documentation de notre ouvrage. Le Professeur LASSEUR a son nom dans la liste des savants qui honorent la France, ce qui n'altère en rien sa modestie. C'est un Maître intègre et dévoué.

Nous remercions bien vivement le Professeur GILLOT et le Docteur VERNIER de l'amabilité avec laquelle ils ont consenti à être nos Juges. GILLOT est un ami, nous l'avons connu comme élève à l'Ecole de Pharmacie, où il nous avait précédé de deux années. Nous avons mené une vie d'étudiant commune, et même pendant la guerre nous sommes nous rencontrés dans le même groupe de brancardiers, lui comme Pharmacien Lieutenant, et nous comme Caporal. Nous n'avons certes pas besoin de nous étendre plus avant, pour qu'il ait les preuves d'une amitié durable, déjà trop vieille hélas.

Le Docteur VERNIER est celui qui seul subsiste à ce jour parmi les membres du corps enseignant de l'Ecole Supérieure de Pharmacie, à l'heure où nous y étions étudiant. Nous l'avons connu préparateur, puis Chef de Travaux, puis chargé de cours. Nous l'avons vu assis au laboratoire de notre père, effectuant pour une publication commune, des dessins ou des aquarelles pour lesquelles il montrait un réel sens artistique. C'est un savant, un érudit, un observateur, c'est aussi un ironiste, et pour tous un charmant camarade.

Parmi les collaborateurs à qui va notre entière gratitude, il nous faut

donner la première place à M. MARCHAL, Docteur ès-sciences, Pharmacien, Assistant au laboratoire de la Faculté de Pharmacie. M. MARCHAL a commencé ses études pharmaceutiques en notre officine où il accomplissait son stage. Il fut un stagiaire docile, studieux. Mais d'élève qu'il était, il est devenu notre Maître, et c'est en grande part à lui que nous sommes redevable de la réalisation de notre travail. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance pour tout ce qu'il a fait pour nous, pour toutes les facilités qu'il nous a procurées, en nous communiquant une documentation inédite et la sienne personnelle, en nous contrôlant, en nous guidant.

Nous n'oublions pas non plus tout ce que nous devons à Madame LASSEUR-DUPAIX, Lauréate de l'Académie des Sciences et de Médecine, ainsi qu'à M. MOREL, Pharmacien.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

L'espèce	1
Classification	5

PRELIMINAIRES

DIAGNOSE EN MICROBIOLOGIE

Morphologie	8
Examen à l'état naturel	8
Aspect et dimensions	8
Motilité	9
Forme et mode de groupement	11
Coloration naturelle des plastides	12
Examen après coloration	12
Structure de la plastide	15
Caractères de culture	18
Action des agents physiques	18
Action des agents chimiques	22
Action des agents biologiques	23
Caractères de culture suivant le milieu	24
Caractères sérologiques	26
Agglutination	26
Caractères physico-chimiques des suspensions	28

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

<i>Micrococcus cyaneus</i> (Schrötter) Cohn 1872	29 et 212
<i>Micrococcus pseudo cyaneus</i> Cohn 1886	31

CHAPITRE II

<i>Bacillus caëlicolor</i> Reiner Muller 1908	33 et 213
<i>Bacillus lacmus</i> Schrötter 1889	39 — 214
<i>Bacillus cæruleus</i> Voges 1893	40 — 215
<i>Bacillus cæruleus</i> Smith 1887	40 — 216
<i>Bacillus pavoninus</i> Forster 1899	46 — 217
<i>Bacillus indigonaceus</i> Claessen 1890	47 — 218
<i>Bacille bleu indigo</i> de Lustig 1893	55 — 220
<i>Bacillus indigoferus</i> Voges 1893	57 — 221
<i>Bacille</i> de Gunther et Spitta 1891	64 — 223
<i>Bacterium</i> H. Rosenberg B 1887	65 — 224

— XIV —

CHAPITRE III

PAGES

<i>Bacillus cyaneo fuscus</i> Beijerinck 1899	67 et 225
<i>Bacille bleu H</i> de Macé 1898	72 — 226
<i>Bacillus viscofucatus</i> 1905	75 — 227
<i>Bacillus polychromogenes</i> Chamot et Thiry 1900.....	80 — 228

CHAPITRE IV

<i>Bacillus violaceus</i> Macé 1888	85 et 229
<i>Chromobacterium violaceum</i> (Bergonzoni) 1920	88 — 230
<i>Bacillus violaceus</i> Laurentius Jordan 1890	90 — 231
<i>Bacillus violarius acetonicus</i> Bréaudat 1906	91 — 232
<i>Bacterium cristallino violaceum</i> Sp. nov. Cholkevitch.....	93 — 233
<i>Bacillus janthinus</i> (Zopf) Flugge 1886	95 — 234
<i>Bacillus lividus</i> Plagge et Proskauer 1887	97 — 235
<i>Bacillus membranaceus amethystinus</i> Eisenberg 1891	99 — 236
<i>Bacillus membranaceus amethystinus</i> I (1913)	102 — 237
<i>Bacillus membranaceus amethystinus</i> II Bampton 1913.....	103 — 237
<i>Bacille violet pathogène</i> de Gauduchau 1907.....	104 — 238

CHAPITRE V

<i>Bacillus pyocyaneus</i> Gessard 1882	106 et 239
<i>Bacillus jasmino cyaneus</i> Klinger 1903	113 — 241
<i>Bacillus syncyanus</i> Ehrenberg 1840	115 — 242
<i>Bacillus cyaneo-fluorescens</i> Zangemeister 1895	121 — 243
<i>Bacillus Le Monnier</i> Lasseur 1912.....	124 — 244
<i>Bacillus caryocyaneus</i> Beijerinck Dupaix 1930	130 — 246
<i>Bacille bleu</i> de Mildenberg 1922	138 — 248

CHAPITRE VI

Germes du groupe <i>mesentericus</i> susceptibles de produire un pigment sur milieux synthétiques	141
<i>Bacillus mesentericus fuscus</i> Flugge 1886	141
<i>Bacillus mesentericus niger</i> Lunt 1896.....	146
Pigments produits par <i>Bacillus mesentericus fuscus</i> et par <i>Bacillus mesentericus niger</i>	151
Origine du pigment produit dans les cultures de <i>Bacillus mesentericus</i>	153

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Les pigments bactériens	155
Préliminaires	155
Siège des pigments	156
Identification des pigments microbiens.....	157
Analyse capillaire	158
Spectre d'absorption	159

Causes d'erreur dans la détermination des pigments	160
Composition des pigments microbiens	160
Action de quelques facteurs sur la chromogénèse bactérienne.....	161
Influence de quelques agents physiques	162
Action de la température sur les Bactéries chromogènes.....	162
Action de la lumière sur les Bactéries chromogènes.....	163
Influence du milieu	163
Influence de l'épaisseur de la couche liquide.....	165
Influence du pH des milieux de culture sur le pouvoir chromogène.	165
Influence des éléments entrant dans la composition du milieu syn- thétique	166
1. <i>Fer</i>	166
2. <i>Magnésium</i>	168
3. <i>Phosphore</i>	169
4. <i>Calcium</i>	170
Aliments azotés et carbonés	170
Influence de la semence dans la production du pigment.....	172
Rôle des pigments bactériens.....	173

CHAPITRE II

Etude de quelques pigments bactériens	177
1. <i>Pigment sécrété par le Bacille polychrome</i>	177
2. <i>Violacéine</i>	180
3. <i>Pigment sécrété par Bacillus le Monnieri Lasseur</i>	186
4. <i>Pyocyanine</i>	188
5. <i>Caryocyanine</i>	193

TROISIEME PARTIE

Classification	197
Variation	207

CONCLUSIONS

(page 211)

ADDENDUM

(page 251)

BIBLIOGRAPHIE

(page 253)

PLANCHES

(voir en fin du volume)

Bacillus caryocyaneus Beijerinck-Dupaix 1930.

Bacillus Le Monnieri 1912.

Spectogrammes.

Ce travail n'a pu être réalisé que grâce à la Bibliographie qui a été mise à ma disposition par Monsieur le Professeur LASSEUR et grâce aussi aux notes inédites de Monsieur le Professeur G. THIRY et de Monsieur le Professeur Ph. LASSEUR.

Note de l'Auteur.

INTRODUCTION

Diagnostiquer un germe pour le classer dans la longue chaîne que forment les microbes est une chose excessivement difficile. Avant de tenter un travail d'ensemble sur un groupe assez étendu de Bactéries, il nous semble nécessaire de préciser comment nous devons concevoir la notion d'*espèce* en Bactériologie et quels sont les caractères judicieusement choisis, qui permettent de donner à un germe le nom qui tiendra lieu simplement de leur énumération.

Nous envisagerons par la suite s'il est possible d'établir une *classification en Bactériologie*.

L'espèce.

Définir l'espèce en Bactériologie est une des plus délicates questions à résoudre. Chaque discipline (zoologie, botanique, etc...) a en effet sa conception de l'espèce et, partant de là, sa définition. En Bactériologie on ne peut considérer l'espèce que comme une réunion d'individus semblables, d'où dérivent des individus identiques entre eux et en même temps identiques à leurs parents.

Chez les Bactéries, comme chez les organismes plus évolués, on doit considérer à la manière du grand biologiste CUÉNOT « *l'espèce comme une collection d'individus présentant un certain nombre de caractères, constants, qui permettent de les identifier, ce qui n'exclut pas leur possibilité de variation* » (1). Les individus d'une même espèce peuvent donc se reconnaître et malgré les variations de plus ou moins grande amplitude, qu'ils sont susceptibles de présenter, ils ne peuvent être confondus avec les espèces voisines, en différant au moins par un caractère.

Le genre se reconnaît de même « *à un ensemble de caractères communs à toutes ses espèces, se manifestant à un moment donné de leur évolution pourvu que les circonstances ambiantes ne troublent pas le développement à ce moment ou ne l'aient pas dévié antérieurement* » VUILLEMIN (1913).

(1) In DUPAIX, 1933.

Malgré la possibilité de distinguer des espèces en Bactériologie, il n'en est pas moins vrai que la différenciation et la délimitation des espèces microbiennes sont au nombre des plus difficiles problèmes que l'on doit résoudre.

La diagnose de l'espèce bactérienne ne peut être faite à l'aide d'un critérium unique. La forme, une aptitude fonctionnelle ne peuvent suffire à caractériser une Bactérie. A l'époque où l'on croyait à une définition étroite et rigoureuse de l'espèce, on a vu prédominer tour à tour la morphologie de la plastide, la forme des colonies sur milieu solide, les fonctions en général, etc...

Toutes ces conceptions ont dû être abandonnées de bonne heure sous l'impulsion des études faites dans toutes les branches de la science. Et on s'est bien vite rendu compte de la nécessité de recourir à un certain nombre de caractères judicieusement choisis pour définir l'espèce bactérienne.

PASTEUR, étudiant les Levures alcooliques, avait maintes fois constaté que des formes, en apparence distinctes, appartenaient souvent à une même espèce. Dès 1862, le grand Savant avait fondé une distinction des être microscopiques en se basant sur les fonctions physiologiques. Celles-ci, en effet, plus que les caractères morphologiques, séparaient d'une façon plus nette les Levures hautes des Levures basses.

De même, la virulence s'est vue de bonne heure abandonnée. Elle implique en effet une lutte entre deux organismes vivants, dont elle ne serait que la résultante.

L'importance accordée successivement à tel ou tel facteur pour la diagnose de l'espèce bactérienne s'explique très facilement, si l'on parcourt rapidement l'histoire de la Bactériologie.

A ses débuts, rattachée aux Sciences naturelles, la Microbiologie étudia tout d'abord la forme des infiniment petits. Le jour où les Chimistes, les Physiologistes, les Médecins signalèrent le rôle important des fonctions, on a dû faire intervenir celles-ci dans la définition de l'espèce.

A partir de cette époque, les Bactériologistes ont établi une certaine subordination dans l'étude des caractères servant de base à la différenciation des germes.

Malgré toutes les tentatives faites, il a été absolument impossible de trouver un petit nombre de propriétés assez nettes et constantes pour définir l'espèce. Il ne faut en effet, pas oublier qu'autour de l'être typique auquel nous donnons un nom spécifique *« se placent et se rangent une foule d'autres êtres qu'on peut faire dériver du premier en mettant en*

jeu des actions physiques ou physiologiques et, dont quelques-uns n'ont plus aucune des propriétés, qui ont servi de définition, tout en conservant avec le premier, le lien d'une liaison régulière, et pouvant en être dérivé à tout instant par des méthodes connues » DUCLAUX (1889).

Si chez les Animaux et les Végétaux supérieurs l'organisation est beaucoup plus compliquée, l'observateur y rencontre néanmoins de nombreux points de repère. Chez les Organismes inférieurs au contraire, il existe souvent une trompeuse ressemblance entre deux espèces bien différentes. De même on peut arriver à méconnaître complètement l'identité de deux formes dérivées l'une de l'autre et soumises à la variation sous l'action des conditions de milieu.

L'école Allemande de KOCH attribuait une importance primordiale à l'aspect macroscopique des cultures sur un substratum solide. De même, le moindre caractère qui aurait seulement dû servir à distinguer des races, permettait au savant Biologiste allemand de distinguer des espèces.

De bonne heure les Microbiologistes ont vu la nécessité d'avoir recours à un certain nombre de caractères pour définir l'espèce.

LASSEUR (1911-1913) signalait l'impossibilité de poser un diagnostic rigoureux en se basant uniquement sur la morphologie externe des Bactéries. Il est inutile de s'étendre longuement sur l'influence du substratum et de sa réaction, du degré d'aération, de l'âge de la culture, etc... sur la forme de la plastide.

Le fait de donner un nom à une souche bactérienne implique donc la présence d'un certain nombre de caractères. Le fait de l'absence de certains d'entre eux mène vers l'incertitude, d'où impossibilité de classer l'organisme sous telle ou telle étiquette. A mesure que s'émiettent les facteurs d'identité on va vers une probabilité décroissante puis vers l'incertitude complète.

Une question se pose néanmoins : parmi les caractères judicieusement choisis, quels sont ceux auxquels on doit attacher une importance primordiale ? Ou bien, comment doit-on classer des particularités si variées grâce auxquelles on reconnaît les divers types bactériens ?

Pour parer à toutes les difficultés, qui se présentaient, les Bactériologistes ont tenté d'établir une méthode d'étude. Les espèces devaient être soumises à une série d'épreuves bien déterminées dont les résultats pouvaient être comparés. Parmi les plans proposés nous en signalerons deux qui sont le complément l'un de l'autre : celui du Comité Américain (1898) et celui de GRIMBERT (1903).

Pratiquement, on répartit ces caractères en plusieurs groupes. La morphologie, les caractères cultureux et les caractères biologiques pourraient comme l'ont proposé NICOLLE et CESARI (1923) être rangés sous le nom de caractères généraux; puis vient le pouvoir pathogène comprenant le pouvoir toxigène et la virulence.

Les caractères antigènes ne doivent pas être négligés, car en dehors de la détermination de l'antigène et de l'anticorps qu'ils permettent, ils peuvent encore servir dans l'établissement des affinités que certains germes peuvent avoir entre eux. Ces relations ne sont pas décelables en effet, ni par l'étude des caractères morphologiques, ni par celle des propriétés biologiques.

M. le Professeur VUILLEMIN estimait que l'appréciation des indices d'affinités, entre les différentes espèces bactériennes, doit se faire en notant :

1° « la forme des éléments (plastides), le nombre, la répartition des fouets moteurs, la coloration par divers procédés »;

2° « la division des éléments suivant une, deux, trois directions déterminées ou sans direction fixe, la forme des colonies, les propriétés des milieux de culture favorables, leurs modifications par la vie des Bactéries et les fermentations bactériennes, réciproquement la variation des éléments et des colonies en fonction du milieu »;

3° « la sporulation »;

4° « les inoculations »;

5° « les séro-réactions ».

A toutes ces caractéristiques il faut ajouter « les caractères physico-chimiques des suspensions » qui présentent un si haut intérêt (DUPAIX, 1933).

Parmi les caractéristiques physiologiques permettant de compléter la diagnose bactérienne il en est une qui a attiré l'attention de beaucoup de Bactériologistes : c'est la production de substances colorantes auxquelles les auteurs ont donné le nom de pigments.

De nombreuses espèces donnant des substances colorées, parfois bien voisines de teinte, sont cependant assez différentes.

Comme le montrait LASSEUR (1913), en étudiant le pouvoir chromogène des Bactéries, l'étude de cette fonction « n'est pas aussi simple qu'on pourrait le croire à priori ». Cependant, étant donné les récents travaux faits sur la structure chimique de certains pigments tels que la pyocyanine, la prodigiosine, la chlororaphine, on doit attribuer au caractère de coloration des cultures une très grande valeur.

Le pouvoir chromogène est susceptible de présenter des variations moins importantes que la forme et la virulence. En 1913 LASSEUR considérait le pouvoir chromogène comme étant, avec les propriétés fermentatives, un des attributs à faire figurer en tête de la liste des caractères devant servir à la diagnose bactérienne.

Classification.

Nul ne saurait ignorer l'importance de la classification dans tous les ordres de la Science. Celle-ci a servi en effet de fil conducteur dans bien des domaines.

En Bactériologie cependant la classification s'est révélée inutile du fait de la grande diversité des caractères que l'on doit utiliser. De plus il est impossible de définir un type bactérien par les caractères d'un de ses éléments. A part certaines études qui peuvent être effectuées sur une unité (morphologie, chromogénèse [cas de *B. prodigiosus*], virulence), en Bactériologie on travaille continuellement sur des populations entières parfois bien hétérogènes. Les caractères attribués à l'espèce ne sont donc qu'une *moyenne* entre les caractères de chacun des éléments entrant dans la composition de ce groupement.

Les Microbiologistes ont donc concentré leurs efforts dans la constitution de catalogues où toutes les espèces admises étaient énumérées et décrites avec leurs caractères essentiels. Certains d'entre eux cependant ont tenté de classer les Bactéries, n'ignorant pas l'importance que cela pouvait présenter. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce sujet à la fin du présent travail.

A l'heure actuelle il est donc encore impossible d'avoir un cadre rigide pour grouper les Bactéries; ceci vient des trop nombreuses causes inhérentes à la diagnose bactérienne, celle-ci nécessitant la réunion d'un trop grand nombre de caractères pour permettre une identification. Néanmoins il faut rendre hommage à tous ceux qui ont cherché à mettre sur pied une classification.

*
* *

Devant de telles difficultés nous ne tenterons pas à notre tour un essai de classification; nous nous contenterons d'adopter dans cet exposé le plan suivant :

Comme préliminaires nous donnerons tout d'abord quelques notions indispensables, concernant la diagnose des germes.

Une première partie, divisée en chapitres, sera consacrée à l'étude :

- 1° des Bactéries bleues et des Bactéries violettes ;
- 2° de certaines Bactéries du groupe *B. mesentericus*, ayant dans des conditions déterminées la propriété de sécréter un pigment.

Nous consacrerons la deuxième partie de ce travail à la chromogénèse bactérienne. Nous soulignerons la diversité des pigments rencontrés chez les Bactéries, leur recherche, leur mode d'isolement, leur différenciation. Ceci étant fait, nous reviendrons dans une troisième partie sur la classification et la variation en Bactériologie.

Nos conclusions souligneront l'intérêt qu'il y aurait à reprendre l'étude des Bactéries chromogènes bleues et violettes : en employant d'une part les milieux chimiquement définis pour faire une étude approfondie de la chromogénèse bactérienne, d'autre part l'analyse spectrographique et microchimique pour identifier les substances pigmentaires.

PRÉLIMINAIRES

DIAGNOSE EN MICROBIOLOGIE

Pour étudier une Bactérie et en permettre l'identification avec une des nombreuses espèces décrites par les différents auteurs, il est nécessaire d'adopter une marche méthodique. Au cours de ce chapitre nous avons l'intention d'énumérer les différents attributs qui doivent être étudiés au cours de telles investigations.

Pour arriver à ce but nous utiliserons le plan qui nous a été proposé par notre Maître M. le Professeur LASSEUR.

DÉSIGNATION ET SYNONYMIE

Un germe bactérien doit toujours être désigné par un binome conforme aux lois de la nomenclature. Il ne faudrait pas cependant oublier de mentionner par la même occasion la synonymie qui peut exister, un même germe pouvant être désigné sous différents vocables. Il sera d'autre part très utile d'accompagner le nom du germe envisagé de celui de l'auteur l'ayant décrit et de la date à laquelle s'est faite cette description.

Dans ce court préambule doit être fourni le nom de la localité où a été effectuée la découverte.

L'espèce ainsi mentionnée a de plus un habitat déterminé, qui doit la faire ranger, du moins provisoirement, dans la catégorie des parasites, des commensaux ou des saprophytes. Elle peut de plus avoir une fréquence plus ou moins grande, ce qui permet de déterminer son ubiquité.

Ces quelques indications étant données on doit s'attacher tout d'abord à préciser la morphologie.

MORPHOLOGIE

I. — EXAMEN A L'ÉTAT NATUREL

Aspect et Dimension

L'aspect d'une Bactérie est quelque chose d'assez variable. Il existe des formes en bâtonnets (*Bacillus*), fusiformes (*Mantegazzia*), rondes (*Micrococcus*) et sinueuses (*Spirosoma*).

La variation des dimensions des éléments rencontrés dans une culture et les discordances observées dans la mensuration expliquent le peu de faveur dont semble jouir ce point important de la morphologie qu'est le facteur longueur et largeur.

La morphologie si en honneur au début de l'étude de la Bactériologie avait fait attribuer une grande importance à la notion de dimensions que possédaient les plastides. Le rôle de la virulence et du pouvoir pathogène qui de bonne heure captiva les esprits devait amener les Savants à négliger la notion de dimensions. Le polymorphisme en effet prenant chaque jour plus d'importance faisait perdre une partie de sa valeur à cet élément de diagnose.

La mise en évidence d'un cycle d'évolution chez les Bactéries devait donner un regain d'actualité au point de vue morphologique.

La biométrie avait en effet suscité de très intéressantes recherches dans le domaine des Sciences naturelles comme dans d'autres ordres de Sciences.

Si GOTTHEIL (1901), GRIMME (1902), A. MEYER (1912), avaient souligné les causes d'erreurs qu'entraînait la mesure des Bactéries, Ph. LASSEUR en inspirant les travaux de NEPVEUX (1920), PALGEN (1925), MINOUX (1926-27), ROLIN (1929), devait apporter de précieuses indications concernant la mensuration des Bactéries.

LASSEUR formula une hypothèse suivant laquelle chez les Bactéries en forme de bâtonnets il existait une relation entre la longueur et la largeur d'un élément (Rapport de LASSEUR). Grâce à l'établissement du rapport $\frac{L}{T}$, PALGEN a montré le rôle de certains éléments chimiques comme agents modificateurs des dimensions bactériennes. A l'aide du même rapport, MINOUX a défini ce qu'on entend par forme bactérienne normale. Les données ainsi rassemblées devaient être appliquées un peu plus tard par ROLIN au Laboratoire de M. LASSEUR.

Mesurer des Bactéries nécessite certaines précautions et la technique à employer dans ce but n'est pas indifférente.

Il existe toute une série de procédés pour parvenir à ce but. Ceux-ci ont été étudiés par MINOUX dans un remarquable travail. Nous les rappellerons cependant brièvement :

1° procédés directs : le plus important de ceux-ci est la filtration. Cette technique est très compliquée car elle est sous la dépendance de trop nombreux facteurs pour être pratiquée d'une façon courante (BECHHOLD).

2° procédés indirects :

a) emploi du micromètre oculaire. Bien que très simple en théorie cette technique ne donne pas pratiquement de bons résultats. Il faut en effet avoir affaire à des Bactéries présentant des granulations polaires bien nettes pour obtenir des résultats précis. D'autre part, il est très difficile d'apprécier des fractions de division du micromètre oculaire.

b) emploi du micromètre objectif : on peut avoir recours au dessin à la chambre claire et utiliser le procédé de LANGERON (1913) complété par LASSEUR et G. PARISOT qui utilisaient une graduation transparente obtenue sur plaque photographique du cliché du dessin de LANGERON.

c) emploi des appareils divers pour projeter ou dessiner les images obtenues à l'aide du microscope.

La forme d'une Bactérie étant l'expression d'un état d'équilibre du microbe avec le milieu (LASSEUR), le milieu utilisé doit avoir une constitution chimique parfaitement définie, pour donner des résultats comparables.

Motilité

Les plastides bactériennes sont les unes susceptibles de mouvements propres, les autres en sont dépourvues. Cette motilité a été bien étudiée pour la première fois par LEEUWENOECK. C'est un excellent caractère dans la diagnose des germes quand on a soin d'en préciser la nature et les conditions dans lesquelles son étude a été effectuée.

Il ne faut pas confondre le mouvement vital avec celui que l'on appelle mouvement brownien, du nom de BROWN qui l'a décrit en 1827.

Le mouvement brownien très important pour de très petites particules dispersées, est très sensible néanmoins chez des éléments de la dimension des plastides bactériennes. Il est le résultat du mouvement incessant qui anime les molécules d'un fluide et des chocs qui en résultent sur les particules en suspension.

Certains germes sont animés de mouvements vifs, d'autres de mouvements lents. La motilité peut s'effectuer suivant une ligne droite ou sinueuse; certaines cellules bactériennes se déplacent par saccades, d'autres lentement. Il est possible parfois de constater une progression par oscillation autour de l'axe de translation, par translation, par rotation rapide autour du petit axe.

La motilité bactérienne varie sous l'action de bien des facteurs. Tout d'abord le stade d'évolution de la plastide est à considérer: au stade sporanges *B. subtilis* est presque toujours immobile.

Il est des cas où les germes peuvent paraître spontanément tantôt mobiles, tantôt immobiles.

Le mouvement est ensuite susceptible de modifications sous l'action de divers agents tels que: le milieu de culture, les substances chimiques, les actions physiques. La viscosité du milieu nutritif obtenue par addition de gélatine, de gélose en certaines proportions peut entraîner l'immobilité de germes mobiles

La motilité peut être de même défavorablement influencée par le froid (LEHMANN et FRIED, 1903), la température: des cultures de *B. chlororaphis* effectuées à la température du Laboratoire présentent encore des cellules se déplaçant avec rapidité après un ou deux mois. Si on opère à 40° C. on ne trouve plus d'éléments mobiles et ceci assez rapidement. A 25-30° C. la motilité persiste encore assez longtemps. LASSEUR (1911), dans son étude sur *B. chlororaphis* a montré que l'acidité ou l'alcalinité du milieu n'influencent pas la motilité des germes d'une façon très sensible, tant que ces facteurs n'entravent pas la végétation. Une trace d'antiseptique tel que l'acide phénique supprime les mouvements vitaux des germes. L'atropine, la codéine activent ceux de *B. chlororaphis* (LASSEUR). La présence ou l'absence d'oxygène détermine l'immobilité de certains aérobies ou de différents anaérobies

La présence de mouvement vital chez un germe implique nécessairement la présence d'organes moteurs que l'on appelle des fouets (1). Les créateurs de la Bactériologie qui étaient des Naturalistes ont fait jouer aux fouets un rôle important dans la diagnose de l'espèce. Nous dirons de suite qu'étant données les difficultés inhérentes à la recherche de ces organes, on ne peut baser une classification sur la position et le nombre des fouets; ce caractère doit seulement fournir d'utiles indications en systéma-

(1) EIRENBERG (1838-1862) le premier signala la présence d'un organe de mouvement ayant la forme d'une *trompe effilée* et déterminant des tourbillons.

tique. Il permet en effet comme l'ont montré LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et ZAHL (1930) de séparer des germes que l'on pourrait confondre facilement.

Les fouets peuvent être situés à un pôle de la plastide ou sur toute sa surface.

Dans le premier cas il peut y en avoir :

1° un seul : *B. pyocyaneus* GESSARD, *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, *B. cyanogenes* HUEPPE FLUGGE ;

2° un à deux : *B. le Monnieri* LASSEUR ;

3° un à quatre : *B. fluorescens putidus* FLUGGE, *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER, *B. chlororaphis* GUIGNARD et SAUVAGEAU.

Dans le deuxième cas on a des Bactéries péritriches tels que :

B. fluorescens albus ZIMMERMANN, Bacille fluorescent pathogène pour les plantes ZACH., *B. mesentericus niger* LUNT.

La longueur des fouets peut aussi être déterminée car « à des stades d'évolution donnés, les fouets d'une même espèce bactérienne ont une longueur approximativement déterminée » (LASSEUR et ses Collaborateurs, 1930).

Forme et mode de groupement

Ces caractères de morphologie externe étant précisés, il est nécessaire d'examiner quelle est la forme et le mode de groupement des plastides. Les éléments peuvent être arrondis, présenter un aspect en bâtonnets ou être sinueux.

S'ils sont arrondis, on a des formes en *cocci* qui peuvent être isolées ou associées. Dans ce dernier cas on observe un groupement sans ordre précis ou suivant un mode caractéristique. Au cours du processus de multiplication, la division, au lieu de s'effectuer suivant un diamètre (*Staphylocoque*) ou suivant deux diamètres perpendiculaires l'un sur l'autre et dans un même plan (*Tetragène*), s'opérera suivant trois plans perpendiculaires dans trois directions différentes. Les masses cylindriques de cocci obtenues dans ce dernier cas sont appelées *Sarcines*.

Parfois nous rencontrons au contraire des éléments en bâtonnets dont certains peuvent être groupés par deux et inclus dans une capsule. Des éléments peuvent être le siège de modifications internes qui à un moment de leur existence les transforment en sporanges.

Coloration naturelle des plastides

Au cours de ce premier examen morphologique et avant de pénétrer plus avant dans l'étude de la structure de la plastide, il est nécessaire de faire mention du pouvoir chromogène.

Certaines Bactéries ont en effet la propriété de sécréter des pigments les uns rouges, d'autres bleus, verts, jaunes, etc... Il faut donc maintenant préciser quel est le siège de ce pigment remettant à une partie ultérieure de cet ouvrage, l'étude de sa nature, de sa formation, de ses propriétés physiques et chimiques.

Sous certaines réserves on peut reconnaître que les plastides d'un grand nombre de formes bactériennes telles que : *B. pyocyaneus*, *B. caryocyaneus*, *B. chlororaphis*, *B. cyaneo-fluorescens*... sont pratiquement incolores, malgré leur propriété de donner, dans les milieux nutritifs où elles vivent, les colorations les plus intenses et les plus belles.

Les Bactéries pourpres au contraire, sont considérées par presque tous les auteurs comme le type de Bactéries colorées. A côté de ces exemples de plastides normalement teintées et de plastides incolores il existe des termes intermédiaires. Ce cas semble être réalisé chez *B. prodigiosus*, *B. Le Monnieri* (A. DUPAIX, 1931), (LASSEUR, VERNIER et A. DUPAIX, 1931).

2. — EXAMEN APRÈS COLORATION A L'AIDE DE RÉACTIFS

Après avoir défini la morphologie externe de la Bactérie, il est nécessaire de pénétrer plus avant dans sa structure et ce, grâce à l'emploi de solutions colorantes.

La membrane de la plastide limite une matière de constitution complexe que l'on appelle le cytoplasme. Celui-ci possède des propriétés particulières et ne peut être considéré comme quelque chose d'homogène au sens des physiciens.

Si le cytoplasme nous apparaît le plus souvent comme quelque chose d'homogène, maintes fois cependant il est possible de percevoir des ponts transversaux. C'est alors qu'il est nécessaire d'avoir recours à des procédés spéciaux d'investigation tels que la coloration, pour mettre en évidence une structure et la présence d'éléments spéciaux dans le suc cellulaire.

L'utilisation de solutions colorantes non phéniquées permet de signaler des détails qui passent inaperçus à un examen direct du matériel. Nous

aurons l'occasion de préciser davantage ce point lorsque nous envisagerons la structure de la plastide.

L'examen de germes à l'état vivant mis en suspension dans un liquide quelconque ne peut suffire à toutes les exigences. La transparence de la plastide bactérienne est parfois si grande qu'il est difficile de la distinguer, sa réfringence se confondant presque avec celle du milieu employé. Bien visible dans les milieux aqueux et sur un substratum constitué par une gélose peptone comme l'a observé HILL (1902), l'observation en est plus difficile dans des liquides visqueux plus réfringents. Si au contraire on a recours à des méthodes de coloration, la Bactérie, teinte d'une nuance éclatante, sera plus facilement repérée. De plus, grâce à certaines techniques, elle pourra trancher sur un fond coloré d'une autre teinte.

Il est donc possible de fixer sur les Bactéries une matière colorante, mais ceci en prenant certaines précautions.

On doit tout d'abord conserver aux éléments leur structure primitive et pour les soustraire à l'action souvent nuisible des liquides colorants il est nécessaire de les fixer dans leur forme en ayant recours à des techniques particulières.

Cette opération de fixation s'effectue le plus souvent à l'aide de la chaleur ou par l'emploi de liquides spéciaux. Ceci étant fait, on examine si le matériel utilisé se colore facilement par des colorants d'aniline tels que le bleu de méthylène, le bleu de toluïdine, le vert malachite, par des colorants rouges tels que la fuchsine.

Parmi les méthodes de coloration qui doivent être utilisées il en est deux qui retiendront plus particulièrement l'attention des chercheurs :

1° la méthode de ZIEHL NEELSEN.

Celle-ci bien connue des Bactériologistes permet de préciser si le germe examiné, coloré avec la fuchsine de ZIEHL voit sa teinte rouge résister à l'action décolorante de l'acide nitrique au 1/3 et de l'alcool à 95° ou de ces deux liquides à la fois. Les Bacilles tuberculeux par exemple colorés par la fuchsine de ZIEHL sont à la fois acido et alcool résistants et se séparent de Bacilles voisins constituant le groupe des Para-tuberculeux, possédant seulement la faculté de résister à l'action décolorante de l'acide, mais pas à celle de l'alcool.

2° la méthode de GRAM.

Depuis les travaux de GRIMME (1902), NEIDE (1904), A. MEYER (1912) on sait que de nombreux facteurs peuvent entrer en ligne de compte dans la coloration de Gram pour en modifier l'allure.

Reprenant cette étude avec ses collaborateurs, SCHMITT (1927), COURRAY (1929), LASSEUR a précisé le rôle capital de la décoloration. Il a de plus déterminé les facteurs qui, en la modifiant, influent sur le résultat de la coloration.

C'est ainsi qu'il a souligné le rôle :

- 1° des germes utilisés ;
- 2° de la nature, de l'âge, de la température, de la concentration du colorant, de son temps d'action ;
- 3° de la solution iodo-iodurée ;
- 4° du décolorant alcool acétone (NICOLLE), alcool absolu, alcool à 95°, alcool à 80° (MEYER et ses élèves) ;
- 5° de la coloration de contraste.

De ces études, résulte la nécessité de substituer à la notion de « *prend ou ne prend pas le Gram* » celle de « *vitesse de décoloration* » (LASSEUR).

Ces quelques restrictions étant faites il est nécessaire d'insister sur l'état de la solution colorante à utiliser. Le pouvoir tinctorial et la stabilité d'une solution colorante varient suivant que l'on additionne l'eau à la solution concentrée ou inversement. Il faut reconnaître d'autre part que les solutions hydro-alcooliques concentrées ont une durée toujours limitée et parfois bien éphémère.

On sait que c'est au stade du « *trouble naissant* » des Bactériologistes (transition entre la solution et la précipitation complète), que l'on obtiendrait les colorations les plus intenses. Les travaux de ZSIGMONDY (1901), les recherches de BOUTARIC et de ses élèves (1931), ont souligné des faits qui devaient modifier le mode de préparation des solutions colorantes. Après ZSIGMONDY qui a montré l'action stabilisante de certaines substances vis-à-vis des solutions colorantes, BOUTARIC a signalé que « *l'addition d'un électrolyte en quantité très faible protège le colloïde contre la floculation produite par des doses plus fortes du même électrolyte* ».

C'est en mettant à profit ces actions stabilisantes et protectrices que LASSEUR, DUPAIX et MAGUITOT (1931) ont indiqué une technique permettant de préparer des solutions colorantes « *standard* » de très grande stabilité.

Depuis, de nombreuses recherches ont été effectuées au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy par LASSEUR et ses Collaborateurs à l'aide de ces solutions qui donnent des résultats cons-

tants (1). Actuellement il est impossible d'étudier la réaction de GRAM sans avoir recours aux solutions colorantes stabilisées.

Structure de la plastide

L'étude systématique d'une espèce bactérienne doit comporter l'examen d'un certain nombre d'éléments entrant dans la constitution de la plastide :

Membrane.

Les Bactéries ou Schizomycètes ont été envisagées par NAEGELI, EHRENBURG, COHN, SCHRÖTTER du point de vue Botanique et dès les premiers temps de la Bactériologie on a signalé la membrane des Schizomycètes.

D'autre part ZOPF, de BARY, MIGULA, P. VUILLEMIN, GUILLIERMOND, PENAU, M et Madame HOLLANDE décrivent la membrane chez de nombreuses Bactéries.

Jusqu'en 1897, l'existence de la membrane ne fut mise en doute par personne et déjà FISCHER (1895) admettait que toutes les Bactéries comprennent une membrane et un protoplasme; mais en 1897 ZETTNOW déclare qu'il lui est impossible de voir une membrane chez les *Spirilles* et chez *B. granulosus*. L'auteur rejette la notion de membrane. Dès 1891, ZETTNOW, utilisant les méthodes de coloration de fouets, arrive à considérer deux parties chez les *Spirilles*: une partie centrale se colorant d'une façon intense, et une partie périphérique très difficilement colorable. La partie périphérique constitue le *plasma* (protoplasma) et la partie centrale le *noyau*.

En 1902 BUTSCHLI considère la plastide de *Spirillum volutans* comme formée par un corps central régulièrement coloré et offrant des grains. Ces grains constituent la partie la plus importante de la plastide. Le corps central est entouré d'une bordure étroitement colorée, à structure alvéolaire et, en 1899, ZETTNOW proposait le terme d'*ectoplasma* pour désigner la partie du plasma qui n'est perceptible qu'après mordantage et coloration de la plastide, le nom d'*endoplasma* étant réservé à la partie du *plasma* qui se colore en bleu par la méthode de ROMANOWSKI. GOTSCHLICH (1912) se range aux conclusions de ZETTNOW.

EISENBERG (1909) fait une subdivision dans l'ectoplasme. Pour lui,

(1) Malgré l'emploi de solutions stabilisées standard il est nécessaire d'utiliser un germe déterminé comme test de décoloration. LASSEUR emploie d'habitude dans ce but une culture de *Staphylococcus aureus*.

l'ectoplasme de ZETTNOW comprend une membrane et une couche corticale.

Il est curieux de constater que tous les auteurs modernes qui parlent d'ectoplasme paraissent attribuer à EISENBERG une théorie qui doit être imputée en réalité à ZETTNOW et qui fut déjà en partie démembrée par EISENBERG. Or, en 1918 ZETTNOW revient sur sa conception première, l'auteur admet l'existence de la membrane même chez les *Spirilles*, mais il déclare ne pouvoir préciser nettement le rapport qui doit exister entre l'ectoplasme tel qu'il l'a défini autrefois et la membrane telle qu'il la conçoit aujourd'hui.

Arthur MEYER (1912) a mis en évidence une membrane chez bien des germes. Il utilisait des réactifs assez complexes déterminant à la fois, tout au moins pour certains, une plasmolyse et une coloration. Ce savant employait couramment la fuchsine formolée en vue de mettre en évidence la membrane chez les Bactéries.

HOLLANDE et ses élèves, à l'aide d'une solution de bleu de Nil (solution aqueuse à 0,2 %) ont démontré l'existence d'une membrane chez les Bactéries.

A. DUPAIX (1933) a été conduite à admettre l'existence d'une couche orientée telle que la conçoit LECOMTE DU NOUY relativement aux hématies. Selon cet auteur bien des faits observés dans la nutrition des Bactéries seraient inexplicables si l'on ne faisait pas intervenir une membrane dans la constitution de la plastide (1).

Capsule.

La question de la capsule chez les Bactéries a été très controversée.

A. MEYER (1912), admettait l'existence de deux parties dans la membrane, l'une très mince, très réfringente, se colorant facilement, correspondrait à la membrane des Bactériologistes; l'autre peu réfringente, se colorant par des méthodes spéciales, disparaîtrait dans certaines conditions, elle constituerait la capsule des Bactériologistes. Du fait de son aspect mucilagineux, A. MEYER serait assez enclin à considérer la capsule comme le résultat du « *gonflement des couches extérieures de la membrane* ».

Si pour certains auteurs le nombre des Bactéries capsulées paraît être

(1) A. DUPAIX préconise pour l'observation de la membrane chez les Bactéries l'examen sur fond noir avec un dispositif permettant de réaliser un champ parfaitement noir où la membrane des éléments microbiens se détache sous forme d'une ligne brillante très réfringente. On pourrait de cette manière percevoir avec une grande netteté les cloisons transversales des éléments bactériens réunis en filaments.

limité à quelques espèces, pour d'autres au contraire, de très nombreux germes seraient susceptibles de présenter une capsule.

Ces divergences s'expliquent très facilement lorsqu'on sait qu'il est nécessaire d'observer des germes tels que le Pneumocoque ou le Pneumobacille dans des milieux contenant de l'albumine ou des hydrates de carbone, pour mettre la capsule en évidence.

L'importance de la capsule paraît être en rapport avec la nature du milieu nutritif dans lequel croissent les Bactéries.

La capsule a suscité de nombreux travaux, mais aucun ne semble avoir apporté des précisions suffisantes pour donner à cette question une solution définitive dans l'état actuel de la Science.

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour la mise en évidence de la capsule chez les Bactéries. Les plus courantes sont celles utilisant la réduction des sels d'argent ou l'emploi des solutions colloïdales.

Cytoplasme.

Vacuole. — C'est MIGULA (1894) qui le premier a mis en évidence et a décrit la vacuole chez les Bactéries. Il établit que chez celles-ci la présence de vacuoles centrales est un fait d'ordre très général. Pour A. MEYER (1912), on peut rencontrer fréquemment plusieurs vacuoles dans la même plastide.

GRIMME (1902) aurait montré qu'elles sont particulièrement bien visibles dans les bâtonnets germinatifs, n'étant pas encore cachées par d'autres inclusions à ce stade de leur développement.

LASSEUR (1911), étudiant *B. chlororaphis*, a montré que dans les cultures jeunes, les Bacilles possèdent un cytoplasme homogène et que dans des cultures vieilles on voit se former des vacuoles qui tout d'abord isolées se fusionnent quelquefois et finissent par occuper une grande partie de la cellule. A ce moment le cytoplasme se condense aux pôles affectant des aspects assez différents.

Les vacuoles sont difficilement perceptibles sans coloration et apparaissent facilement lorsque les plastides sont traitées par du bleu de méthylène ou par la solution iodo-iodurée préconisée par A. MEYER.

Par contre chez les plastides fixées par la chaleur ou tout autre procédé les vacuoles démesurément grandes seraient considérées comme étant le résultat d'une altération due à la fixation.

Dans l'étude du contenu cytoplasmique il est donc de toute nécessité d'opérer sur le frais ou avec des colorations vitales car on s'expose, en utili-

sant du matériel fixé, à obtenir des modifications considérables du système colloïdal contenu dans la cellule. La vacuole a été particulièrement bien étudiée par A. DUPAIX (1932) (1).

Noyau. — La question du noyau est quelque chose de tout à fait complexe. De très nombreux auteurs en ont fait le but de leurs recherches. L'existence d'un noyau a été niée par certains, tels que FISCHER, MIGULA; d'autres ont au contraire, été partisans de son existence. Parmi ceux-ci certains ont tenté d'assimiler toute la cellule, le protoplasme, la membrane, les vacuoles à une formation nucléaire. D'autres ont vu dans les grains métachromatiques les éléments porteurs des qualités héréditaires.

Des savants sont partisans de l'existence d'un organite à contour bien défini ou d'un noyau diffus. Malgré les travaux de nombreux auteurs, la question du noyau n'est pas encore résolue. Les faits observés par SCHAUDINN ne sont nullement probants. Rien ne prouve que le germe étudié par ce savant soit une Bactérie. Il en est de même de *B. gammari* étudié par VEJDOVSKY. Tels sont les avis de GUILLIERMOND et A. MEYER qui sont les auteurs les plus au courant de la question du noyau chez les Bactéries.

LASSEUR, MARCHAL et A. DUPAIX (1931) estiment que tout travail effectué sur un matériel dont l'origine bactérienne n'est pas démontrée ne doit être accepté que sous les plus expresses réserves.

A la suite de toutes dernières recherches RIPPEL (1932) écrivait: « *il n'existe pas de noyau morphologiquement définissable chez les Bactéries* ».

CARACTÈRES DE CULTURE

ACTION DES AGENTS PHYSIQUES

1. — Température

L'être vivant est constitué de complexes colloïdaux qui sont sans cesse en voie de transformation; ils n'acquièrent leur équilibre final que lorsqu'ils sont arrivés au stade de la coagulation à partir de laquelle les systèmes obtenus sont irréversibles.

La température exerce une influence très importante sur les processus biologiques. Elle hâte la vitesse des réactions, dont l'individu est le siège et elle l'achemine plus ou moins rapidement vers sa destruction.

(1) In *Bulletin Assoc. des diplômés de Microbiologie*, N° 5, 1932.

L'édification de la substance plastidulaire et la multiplication de la Bactérie sont sous la dépendance du facteur thermique. La vie de l'élément bactérien n'est possible qu'entre certaines limites bien déterminées, elle offre un maximum à une température particulièrement favorable qui est appelée température optimum.

Les espèces bactériennes possèdent un optimum, un minimum et un maximum de température de culture qui varient suivant les espèces considérées. La température optimum est beaucoup plus proche de la température maximum que de la température minimum.

La sporulation, la germination, la multiplication cellulaire peuvent s'effectuer à une température optimum identique, mais bien souvent il n'en est pas ainsi, tel le cas des températures où ALMQUIST (1922) aurait montré l'existence de phénomènes sexués chez les Bactéries.

Le maintien à la température optimum a pour effet de déterminer une diminution de la vitalité bactérienne en même temps qu'une atténuation de certaines fonctions, par exemple la fonction chromogène, la faculté de donner des spores etc...

De ces considérations doivent découler des principes tout à fait importants pour la conservation des collections. Les souches que l'on doit conserver ne doivent pas être placées à une température voisine de la température optimum, sinon on provoque une mort rapide des cultures. Les premières heures de développement doivent seulement s'effectuer à une température optimum mais rapidement les germes doivent être ramenés à une température, où l'assimilation et la désassimilation ont à peu près la même valeur.

A. DUPAIX (1933) a souligné l'importance de ces faits dans son remarquable travail sur *B. caryocyaneus*.

Pour caractériser un germe il peut être très intéressant de déterminer sa température mortelle. Il ne faut cependant pas oublier que dans une même suspension bactérienne tous les éléments ne sont pas également sensibles à l'action des différents agents physiques. Il y a une série de températures mortelles pour les Bactéries constituant ces suspensions. On peut déterminer la mort des éléments constituant une culture, en agissant soit sur le facteur temps, soit sur le facteur température. Pour que cette notion ait une réelle valeur il faut préciser et la température à laquelle on a opéré, et la durée d'action de cette température. Il ne faut pas oublier non plus d'indiquer l'espèce microbienne utilisée, la souche, l'âge de la culture (on doit souligner l'existence ou l'absence de formes de résistance), la nature du liquide dispersif, la concentration en éléments bactériens, la

masse chauffée, l'accès de l'oxygène et le milieu utilisé pour déceler les germes qui auraient résisté à la suite du chauffage (1).

2. — *Lumière*

Des expériences anciennes ont mis en évidence l'action catalysante ou activante de la lumière sur les processus chimiques. Tout le monde connaît l'action de la lumière sur un mélange de gaz hydrogène et de gaz chlore. En Bactériologie, on observe des phénomènes analogues. La lumière agit sur le milieu, sur la plastide. Certaines substances, ajoutées au milieu de culture, peuvent encore se conduire comme des véhicules d'énergie et transmettre au substratum nutritif l'énergie reçue de la lumière. C'est le cas de certaines matières colorantes.

La lumière agissant sur le milieu en modifie considérablement la constitution, c'est ainsi qu'elle peut y former des acides, de l'eau oxygénée, de l'ozone. La lumière acidifie les milieux de culture, oxyde les corps gras et les saponifie, oxyde les sucres en milieux alcalins. Toutes causes qui agiront de façon notable sur la vie du germe.

Si la lumière n'agit pas directement en détruisant les spores de certaines Bactéries, elle s'oppose du moins à la germination par les produits d'oxydation dont elle détermine la formation dans les milieux de culture.

En règle générale la lumière est particulièrement nuisible aux Bactéries dépourvues de pigment.

Lorsqu'on étudie l'action de la lumière solaire sur ces organismes, il est nécessaire de faire intervenir la pression d'oxygène, la température, la dessiccation ou le degré d'humidité.

L'action de la lumière dépend de son intensité d'une part (*quantité*) de la nature des radiations d'autre part (*qualité*). La lumière diffuse est très peu active et peut même avoir une action nulle. Les rayons rouges semblent favoriser le développement des microbes. Les rayons ultra-violets ont une action néfaste sur les plastides bactériennes.

Dans les essais d'insolation, la durée d'exposition aux rayons influe considérablement sur la nature des microbes. Il est possible de faire perdre leur pouvoir chromogène à des cultures de *B. prodigiosus* ou certains germes chromogènes. Une culture de *B. anthracis* soumise à l'insolation peut également perdre sa virulence.

(1) Nous renvoyons le lecteur au travail de A. DUPAIX (1933) pour la technique expérimentale à suivre dans l'étude de l'action de la température sur les germes bactériens.

Les Bactéries qui ont été tuées par l'action de la lumière présentent à l'examen microscopique une désorganisation particulièrement profonde, se traduisant par l'apparition de nombreuses granulations. On peut parfois noter de même une perte d'affinités pour certains colorants.

3. — Oxygène

Pour se développer certains germes exigent de l'oxygène libre, tandis que d'autres empruntent cet oxygène à des combinaisons diverses. C'est en se basant sur ces considérations que l'on a divisé les Bactéries en aérobie et anaérobies. On conçoit facilement l'existence d'un groupe intermédiaire constituant l'aérobie facultatif.

Si certaines Bactéries ne peuvent se multiplier qu'en présence d'oxygène, les germes chromogènes exigent, eux aussi, la présence de cet élément pour manifester leur fonction chromogène. La formation du voile à la surface des cultures, celui-ci parfois très pigmenté, prouve à elle seule ce besoin d'oxygène.

Il est possible de déterminer d'une façon précise les limites de tension d'oxygène nécessaire au développement des microorganismes. Comme pour la température il existe les pressions minima, optima et maxima que l'on exprime en atmosphère. Si *B. pyocyaneus* exige une pression d'oxygène assez élevée, *B. cyanogenus* peut se contenter d'une tension d'oxygène moindre.

L'abaissement de la tension d'oxygène retentit sur la plastide bactérienne par la suppression de certaines manifestations vitales telles que la motilité, le pouvoir chromogène, la phosphorescence, la sporulation. Lorsque la tension est abaissée au-dessous d'un certain minimum toute végétation est arrêtée. Si l'absence d'oxygène se fait sentir trop longtemps, la Bactérie meurt.

L'élévation de la tension au-dessus de l'optimum est nuisible elle-même aux Bactéries. Les germes aérobies sont précisément les plus sensibles à l'augmentation de la pression.

Aux germes anaérobies facultatifs appartiennent de nombreuses espèces pathogènes.

C'est à PASTEUR que revient la découverte de la vie anaérobie. Des recherches précises ont montré que les Bactéries anaérobies peuvent se développer dans des milieux où les réactifs, réputés les plus sensibles actuellement, ne permettent pas de déceler la présence d'oxygène libre.

Il est à remarquer que les Bactéries anaérobies sont surtout sensibles

à l'action de l'oxygène durant les premières heures de leur développement. Passé ce stade les cultures sont moins sensibles à de petites quantités d'oxygène, ce qui s'explique par la présence de corps réducteurs normalement développés dans les cultures microbiennes.

En cultivant des Bactéries anaérobies dans des milieux de plus en plus riches en oxygène, à la condition bien entendu d'opérer très progressivement, on arrive à faire pousser le Vibrion septique, le Bacille du tétanos sur des milieux aérobies.

ACTION DES AGENTS CHIMIQUES

4. — *Substances toxiques antiseptiques*

E. DUCLAUX (1898) montrait combien il était impossible d'établir une délimitation nette entre l'antiseptique et l'aliment. Certains corps, à des concentrations faibles, peuvent jouer le rôle d'aliment ; à doses plus fortes ils empêchent tout développement bactérien.

Il existe des concentrations critiques pour bien des substances, mais celles-ci sont fonction de l'espèce bactérienne utilisée, en un mot de « *l'origine de la semence* ».

DUCLAUX a montré que l'addition de doses croissantes d'antiseptiques provoquerait tout d'abord l'activation de la fermentation alcoolique, se manifestant par un plus grand dégagement de CO_2 , qui va ensuite en diminuant à mesure que la concentration en antiseptique augmente.

Agissant sur les fonctions vitales des plastides bactériennes, les antiseptiques se comportent de façon différente : « *les uns coagulent, précipitent les systèmes colloïdaux constitutifs de la cellule, les autres déterminent l'hydratation ou la peptisation de l'élément bactérien* ». (A. DUPAIX, 1933).

Le pouvoir antiseptique d'une substance est fonction du germe utilisé, de la substance elle-même, du milieu de dispersion, du temps de contact, de la température, de l'action de cette substance sur la perméabilité de la membrane. En ce qui concerne le germe on doit en mentionner l'espèce, la souche, la race, l'âge des cultures, l'origine de la semence, les variations individuelles dont il peut être le siège. On doit préciser en outre la concentration de la suspension en germes et toutes indications concernant la préparation de celle-ci.

L'agent chimique de son côté doit être rigoureusement défini au point de vue de sa constitution chimique, de son poids moléculaire, de son de-

gré de dispersion, de sa concentration, de son rapport S/V, (1) de la charge électrique de l'ion toxique et de sa diffusibilité dans les liquides.

En général on détermine le pouvoir antiseptique d'une substance en fonction du pouvoir antiseptique du phénol. RIDEAL et WALKER (1921) avaient décrit la méthode du coefficient phénol. J. REGNIER et S. LAMBIN (1931) ont essayé d'améliorer cette technique en précisant davantage les conditions expérimentales dans le but d'étudier non seulement les valeurs antigénétiques (*comme le faisait la plupart des auteurs*), mais encore les valeurs antibiotiques.

Les antiseptiques agissent sur la végétation et ils déterminent chez les germes des modifications morphologiques parfois très importantes. WASERZUG, en 1888, a signalé l'influence des antiseptiques sur le pouvoir chromogène de différentes Bactéries. A. DUPAIX (1933) a montré que la fonction chromogène de *B. caryocyaneus* était peu influencée par l'acide phénique.

ACTION DES AGENTS BIOLOGIQUES

Association

Le mot association microbienne implique une union d'organismes pour un même intérêt. Or dans les associations, au sens des Bactériologistes, le bénéfice n'est pas toujours réciproque. Souvent une espèce se développe au détriment d'une autre. Quelquefois elle ne peut édifier son protoplasme qu'à l'aide des matériaux empruntés aux plastides de l'espèce asservie. Avant d'entrer plus avant dans l'étude de cette importante question, nous signalerons les remarquables recherches de M. le Professeur VINCENT sur les Associations microbiennes.

En Bactériologie on peut parler de mélange bactérien ou d'association bactérienne. Nous emploierons l'une ou l'autre de ces désignations.

Les associations bactériennes doivent être étudiées *in vivo* et *in vitro* car les résultats obtenus dans les deux cas ne sont forcément pas identiques. La vie d'un germe dans un tube à essai est-elle le reflet des processus vitaux de ce même germe dans la nature? Il nous est permis d'en douter.

(1) « La tension superficielle d'une solution colloïdale dépend de la concentration mais aussi du volume de la solution et de la surface qui lui est offerte, ou plus exactement du rapport de ces deux quantité S/V ». P. LECOMTE DU NOUY (1931). Conférence faite au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy. Fascicule II, 1931.

Dans les mélanges *in vitro* il faut distinguer d'une part l'action favorisante (stimulation), d'autre part l'action empêchante (antibiose). Celles-ci peuvent être unilatérales ou bilatérales réciproques.

Les mélanges *in vivo* ne se comportent pas rigoureusement de la même façon, car il faudrait assimiler l'organisme à un milieu inerte de culture, ce qui n'est pas le cas. L'organisme réagit contre le matériel bactérien. Le germe peut exercer son action de façon différente suivant que celle-ci s'opère *in vitro* ou *in vivo*.

Rappelons l'exemple de *B. prodigiosus* doué d'une action empêchante vis-à-vis de *B. chauvei* lorsqu'ils sont inoculés en même temps au cobaye et cependant *in vitro* *B. prodigiosus* n'exerce aucune action sur *B. chauvei*.

Dans les associations *in vivo* il faut distinguer de même une action favorisante (synergie) et une action empêchante (antagonisme). Celles-ci pouvant être elles-mêmes unilatérales ou bilatérales réciproques.

L'action stimulante peut s'exercer sur la vitesse de multiplication d'un germe et sur ses différentes fonctions; son mécanisme d'action paraissant assez simple est très variable. On ne saurait cependant, dans l'état actuel de la question, tenter une généralisation. Néanmoins l'agent microbien favorisant peut agir par modification de la réaction du milieu, par production d'une substance stimulante, par modification de l'aliment (VUILLEMIN), par soustraction d'une substance nocive.

L'antibiose peut s'expliquer de même par production d'une substance modifiant la réaction des cultures ou exerçant une action toxique inconnue, ou bien par appauvrissement du milieu par suite de la diminution ou de la disparition d'un élément absolument indispensable à la vie.

S'il est déjà si difficile de préciser le mécanisme de la stimulation et de l'antibiose, il est encore bien plus compliqué de tenter une explication de la synergie et de l'antagonisme. Si les modalités de ces phénomènes nous sont encore inconnus, les faits qui peuvent en ressortir n'en possèdent pas moins une importance considérable dans de nombreuses questions biologiques.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

L'étude des caractères morphologiques des germes, de l'action des différents agents physiques, chimiques, biologiques, ne peut permettre le diagnostic et la définition suffisante d'une espèce.

Il est absolument indispensable de compléter l'identification des germes par l'étude des phénomènes physiologiques. Certains d'entre eux ont at-

tiré plus particulièrement l'attention des Bactériologistes au cours des temps.

PASTEUR (1862), parlant des Levures alcooliques, avait basé une distinction des êtres microscopiques sur la connaissance de leurs fonctions physiologiques. En effet celles-ci, plus que les caractères morphologiques, separent Levure haute et Levure basse de Brasserie.

L'Ecole allemande de KOCH attribuait une importance de premier ordre à l'aspect macroscopique des cultures sur milieux solides.

L'étude des germes bactériens envisagée jusqu'ici doit être complétée par la description des caractères de culture sur les différents milieux utilisés en Bactériologie. A ce sujet nous distinguerons les milieux de culture usuels tels que les milieux solides (*gélose, gélatine, pomme de terre, carotte, artichaut, etc*), les milieux liquides (*bouillon, eau peptonée, lait, etc...*), puis les milieux synthétiques chimiquement définis dont le rôle est si important en Bactériologie.

En dehors des conditions d'aération et de température indispensables au développement (*Bacille tétanique, Gonocoque, Méningocoque*) la rapidité et la durée du développement peuvent fournir des critères importants.

La croissance rapide ou lente peut s'arrêter rapidement ou présenter des poussées successives. Ceci peut être d'un très gros intérêt en ce qui concerne la possibilité de l'existence du bactériophage, si bien mise en évidence dans certaines cultures par d'HERELLE et ses collaborateurs, HAUDUROY, etc...

L'aspect des cultures bactériennes est conditionné par de très nombreux facteurs dépendant du milieu nutritif. Les caractères présentés par une culture ne peuvent être constants que lorsqu'on se place dans des conditions rigoureusement identiques. Pour vérifier cette assertion il nous suffira de souligner les nombreuses variations qu'il est possible d'observer lorsque l'on étudie le pouvoir chromogène des germes sur les milieux usuels tels que: bouillon, eau peptonée, dont la constitution est infiniment variable.

LASSEUR qui est incontestablement l'auteur ayant le plus contribué à mettre en lumière l'importance du pouvoir chromogène dans la diagnose bactérienne, a montré avec ses collaborateurs le rôle de traces extrêmement faibles de fer, de cuivre, de magnésium, etc... sur la chromogénèse. Dans une étude sur *B. le Monnieri*, LASSEUR (1913) insiste sur la nécessité d'utiliser des milieux synthétiques de composition rigoureusement définie, pour mettre en évidence la propriété chromogène des Bactéries.

En étudiant les pigments nous aurons l'occasion de jeter un aperçu rapide dans lequel nous signalerons l'influence de certains ions sur le pouvoir chromogène des germes.

Nous n'insisterons pas davantage sur cette question. Nous soulignerons seulement l'importance d'effectuer des descriptions rigoureuses des caractères de culture observés et de préciser toujours les conditions dans lesquelles on a opéré.

CARACTÈRES SÉROLOGIQUES

AGGLUTINATION

Le phénomène de l'agglutination est très en honneur en Bactériologie depuis la remarquable découverte de CHARRIN et ROGER en 1889. Ces savants avaient en effet remarqué qu'en ensemençant du Bacille pyocyanique dans du sérum de Lapin normal et dans du sérum de Lapin vacciné, les aspects culturels étaient tout à fait différents. En effet, alors que le sérum de Lapin normal est complètement opaque, « *celui des vaccinés peut rester clair, les microbes sont réunis en petits amas qui s'éparpillent quand on agite le tube, mais retombent au fond quand on le laisse au repos* », (CHARRIN et ROGER, 1889).

Cette première observation a été complétée par l'étude macroscopique et microscopique du phénomène faite par ces Savants. Celle-ci leur révéla que les plastidesensemencées sur des sérums d'animaux vaccinés « *ont une tendance à se grouper et au lieu de nager librement comme les Bacilles normaux, on les voit s'enchevêtrer en petits amas ce qui explique sans doute l'aspect grumeleux des cultures* » (CHARRIN et ROGER, 1889).

Depuis cette époque les faits se sont considérablement multipliés et le phénomène de l'agglutination consistant soit dans le développement en amas des Bactéries cultivées dans un milieu liquide additionné d'anti-sérum homologue, soit dans une agglomération des Bactéries réparties uniformément dans un liquide lorsqu'on ajoute l'anti-sérum correspondant à ce milieu, a suscité de nombreux travaux qui ont complété et confirmé la découverte de CHARRIN et ROGER.

L'explication simple de l'agglomération sérique des microbes donnée par GRUBER (1896) qui admettait l'existence d'une substance ayant la propriété de gonfler la membrane des Bactéries a dû être abandonnée.

Dans une série de remarquables publications LASSEUR et A. DUPAIX ont été conduits à une théorie physico-chimique de l'agglutination. Ils ont

montré que les Bactéries en suspension dans l'eau distillée étaient chargées négativement et que la force de répulsion des Bactéries n'était pas immuable. Ceci se vérifie facilement lorsque par fixation d'ions positifs on abaisse la charge électrique, ce qui entraîne une diminution de la force de répulsion. La force de répulsion maintient les plastides éloignées mais l'examen microscopique d'un système agglutinant où la formation des amas est lente, montre l'existence d'une force qui tend à rapprocher les éléments bactériens.

Bien des facteurs sont susceptibles de modifier cette agglomération des éléments bactériens : la viscosité du milieu diminue la vitesse de déplacement des Bactéries et partant, leur réunion en amas. Certaines substances colloïdes, électrolytes, un chauffage à 80° C., ont la propriété de stabiliser les suspensions bactériennes.

Il ne faut pas oublier que la fixation de l'anticorps sur l'antigène homologue ne détermine pas nécessairement, comme l'a montré BORDET (1899), la précipitation de l'antigène. Il est possible de stabiliser des systèmes agglutinants.

LASSEUR et A. DUPAIX, dans de très nombreux mémoires remarquables consacrés à l'agglutination (1), ont expliqué la spécificité des réactions anticorps en faisant intervenir la notion d'adsorption orientée.

LASSEUR a montré que toutes les réactions anticorps sont des réactions limitées pour les zones de forte concentration et que seules les zones de faible concentration paraissent montrer une réaction totale.

L'agglutinabilité est une propriété de la plupart des éléments monocellulaires, variant avec les espèces ; elle peut même varier parfois au sein d'une même espèce.

Les sérums spécifiques outre leur action sur le germe homologue ont de plus la propriété de coagglutiner aussi fréquemment des espèces hétérologues. Le taux d'agglutination spécifique est cependant toujours supérieur à celui des coagglutinations. La substance agglutinogène d'une Bactérie peut être considérée comme formée de récepteurs partiels entraînant la production d'une agglutinine partielle correspondante, celle-ci ayant une spécificité rigoureuse. Ce sont les agglutinines partielles communes à deux espèces qui entraînent la coagglutination.

CASTELLANI (1902) a montré que le germe homologue mis au contact d'un sérum le dépouillait de ses agglutinines et coagglutinines et qu'un sé-

(1) In *Archiv für Microbiologie*, 1 band, 1 Heft, 1930.

rum mis en présence d'un germe hétérologue qui est coagglutiné perd seulement son action coagglutinante pour ce germe.

Ces quelques notions étant rappelées, on comprend fort bien le rôle que l'agglutination est susceptible de jouer dans la diagnose bactérienne. Possédant un anti-sérum déterminé il est donc possible d'identifier un germe. Et du fait de l'existence de coagglutinines on peut établir des parentés sérologiques de la plus haute importance pour tenter une classification des Bactéries.

CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUSPENSIONS

Si la plastide bactérienne a absolument besoin de certains ions pour assurer son métabolisme, il en est parmi ceux-ci qui peuvent avoir une grande importance et modifier d'une façon considérable les suspensions bactériennes.

L'agglutination des Bactéries par les substances chimiques est une question déjà assez ancienne, qui a été étudiée par MALVOZ en 1897.

Tous les Savants qui s'étaient intéressés à cette question pensaient pouvoir différencier d'une façon certaine des germes assez voisins. L'expérience ne leur donna pas raison, mais MICHAELIS (1911) admettait volontiers l'existence pour chaque espèce bactérienne d'une concentration en ions H^+ optima nécessaire pour sa précipitation. Malheureusement les expériences faites par MICHAELIS ne pouvaient être l'objet d'une généralisation car elles étaient trop peu nombreuses. Les recherches ultérieures de POPPE (1913), EISENBERG (1919), LASSEUR (1921-23) devaient montrer :

1° que toutes les espèces microbiennes ne précipitent pas par les ions H^+ ;

2° que dans une même espèce il était possible d'observer des souches peu ou pas précipitables par les ions H^+ .

L'étude de la stabilité des suspensions bactériennes sous l'action des acides semblait avoir perdu beaucoup de sa valeur lorsqu'en 1921 LASSEUR montra que les souches non précipitables par les ions H^+ pouvaient l'être par les ions à charge triple tels que AL^{+++} , Fe^{+++} .

Ces quelques notions étant rappelées nous allons étudier maintenant les Bactéries bleues et violettes, qui font l'objet de ce travail.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

MICROCOCCUS CYANEUS (SCHRÖTTER) Cohn 1872

Micrococcus cyaneus a été décrit tour à tour sous les noms de *Bacteridium cyaneum* SCHRÖTTER 1872, *Micrococcus cyaneus* COHN 1872, *Blauer coccus* 1887.

Micrococcus cyaneus se présente sous la forme de cocci, il a été rencontré sur des pommes de terre cuites, laissées à l'air, sur lesquelles il formait une mince pellicule d'un bleu cobalt.

Il fut étudié par SCHRÖTTER en 1872 et quelques mois plus tard par COHN.

MORPHOLOGIE

Micrococcus cyaneus est immobile ne possédant pas de fouets. Sur pomme de terre il offre l'aspect d'un microcoque petit elliptique (COHN et SCHRÖTTER).

Sur une préparation fixée et colorée il constitue des amas irréguliers.

Examiné sur le frais il paraît coloré en bleu très clair. Il ne donne pas de spores. Il se multiplie seulement par division et cela assez lentement.

COLORABILITE

Micrococcus cyaneus ne prend pas le Gram, n'est pas acido-alcool résistant et se colore par les couleurs d'aniline.

TEMPERATURE

Ce germe pousse à la température ordinaire (15° à 20° C.). Il se développe bien sur milieu minéral à 30° C.

AÉROBIOSE

C'est un germe aérobic.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Ensemencé en piqûre sur gélatine *Micrococcus cyaneus* ne croît qu'à la surface. Les colonies sont nettement délimitées avec un centre bleu, entouré d'une sorte de réseau irrégulier. La gélatine n'est pas liquéfiée et présente, d'après SCHOLL (1889) une fluorescence verte. Ces cultures dégagent une odeur fade de colle d'amidon.

Gélose. — Cultivé sur gélose, ce germe donne des colonies bleues, mais ce milieu lui est moins favorable que la gélatine.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre, *Micrococcus cyaneus* donne une mince pellicule bleu cobalt, visqueuse. Le pigment diffuse et pénètre dans le substratum sur une profondeur de plusieurs centimètres. COHN observe parfois une coloration vert de gris intense.

Albumine, lait. — *Micrococcus cyaneus*, ensemencé sur albumine d'œuf, donne seulement la fluorescence verte qui passe au brun feuille morte en vieillissant, tandis que sur lait il donne seulement le pigment bleu.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES. — FONCTION CHROMOGÈNE

COHN en 1872 utilisait un milieu nutritif additionné de 2 cm³ de solution saturée de tartrate de potasse et de 2 cm³ d'acétate d'ammonium. Il voyait se former à la surface du liquide une mince pellicule composée de germes sphériques. Au bout de neuf jours de culture à 30° C. le liquide se colorait en bleu vert. Cette coloration devenait d'un bleu plus pur de jour en jour et en vingt jours ressemblait à celle d'une solution de sulfate de cuivre.

PIGMENT

Le pigment de *Micrococcus cyaneus* est soluble dans l'eau en donnant une solution bleu cobalt qui passe au rouge carmin sous l'action des acides tandis que par neutralisation la solution redevient bleue.

Le spectre d'absorption du pigment montre une absorption continue de la partie la moins réfringente du spectre lumineux et ne présente pas d'absorption sélective.

MICROCOCCUS PSEUDO CYANEUS Cohn 1886

Micrococcus pseudo cyaneus croît comme *Micrococcus cyaneus* sur les pommes de terre cuites et dans les solutions minérales.

PIGMENT

Il produit d'abord un pigment vert gris pouvant devenir bleu verdâtre ou bleu. Quelquefois il garde sa teinte vert gris.

Traité par les acides il devient rouge ; il est ramené par les alcalis à sa nuance primitive.

Les caractères morphologiques de cette espèce comme ceux de *M. cyaneus* SCHRÖTTER ne sont pas suffisamment connus.

CHAPITRE II

BACILLUS CÆLICOLOR Reiner Muller 1908

B. cælicolor a été isolé en même temps que *Streptothrix cælicolor* par REINER MULLER en 1908.

MORPHOLOGIE

Ce germe se présente sous la forme de petits bâtonnets d'une largeur sensiblement égale à celle du Bacille diphtérique, mais de longueur moindre. Il a été rangé par REINER MULLER dans le groupe des Bacilles diphtériques.

Assez rarement cependant ce savant a rencontré des formes en massue dans des cultures sur pomme de terre effectuées à 36° C. Les cultures âgées présentent des formes ramifiées.

MOTILITE

Toutes les formes observées étaient immobiles et ne présentaient pas de fouets.

MODE DE GROUPEMENT

Le mode d'association des plastides est variable suivant l'âge de la culture, les formes rencontrées et les milieux utilisés. Les éléments jeunes sont groupés en V ou en amas analogues à ceux du Bacille diphtérique. Parfois on constate la présence de Bacilles isolés, environ deux à trois fois plus longs que larges. Dans les cultures sur lait, conservées pendant un certain temps à la température du laboratoire, on voit apparaître des formes ramifiées. Les cultures sur gélatine donnent des formes plus longues encore, tandis que le sérum coagulé et la gélose bouillon ne permettent d'obtenir que des éléments très courts ; les Bacilles sont si courts qu'il est très difficile de les différencier des cocci ovoïdes.

SPORES

B. caëlicolor ne présente pas de spores.

COLORABILITÉ

Le germe d'après MULLER prend bien le Gram. La méthode de NEISSER colorerait d'une façon élective les éléments isolés seulement.

TEMPÉRATURE

B. caëlicolor se développe à des températures variant de 15° C. jusqu'à 36° C. Mais l'optimum de température est entre 22° et 25° C. pour sa multiplication comme pour sa chromogénèse. Cette dernière disparaîtrait complètement à 36° C.

AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Les cultures de *B. caëlicolor* doivent être conservées à l'abri de la dessication et de la lumière; dans de telles conditions elles sont vivaces et donnent encore un développement après plus d'un an de séjour à la température ordinaire.

Pour végéter *B. caëlicolor* réclame un milieu légèrement acide. Il ne peut croître d'habitude dans la profondeur du milieu.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélose. — Une culture de quelques jours prend sur gélose l'aspect d'un enduit blanc grisâtre, humide, contenant de nombreux petits cristaux. L'addition à la gélose de 5 % de chlorure de sodium ne semble pas gêner la culture.

Gélose glycéinée. — La culture en strie sur gélose glycinée donne des colonies visqueuses, élastiques qui s'enlèvent difficilement avec un fil de platine. La culture se fait d'ailleurs plus lentement que sur gélose ordinaire.

Gélose glucosée. — En cultivant *B. caëlicolor* sur gélose glucosée on obtient des colonies analogues à celles observées sur gélose glycinée. Dans les vieilles cultures les colonies sont encore plus visqueuses et gommeuses.

Gélose d'Endo. — Il a été impossible d'obtenir une culture sur gélose d'Endo malgré des essais répétés.

Gélose au lait. — Sur gélose au lait apparaissent des colonies bleues qui après plusieurs jours deviennent jaune-brun.

Gélatine. — La gélatine semble assez favorable au développement de *B. caëlicolor*. Elle se liquéfie lentement en devenant glaireuse et filante. C'est ce que l'on observe de même sur sérum coagulé. On peut accélérer la croissance de la culture en ajoutant du glucose ou au contraire la diminuer en acidifiant la gélatine ou en y ajoutant de la glycérine.

Pomme de terre. — La pomme de terre constitue un milieu d'élection pour *B. caëlicolor*. Il s'y développe très rapidement, ce que l'on peut déjà constater 14 heures après l'ensemencement. Au bout de deux ou trois jours, les régions environnant le point ensemencé se colorent en bleu clair, tandis que la culture elle-même est beaucoup moins colorée. Peu à peu la pigmentation envahit tout le tubercule. Après un délai de huit à quatorze jours apparaît une coloration jaune brun sale : le développement est alors si abondant que la culture déborde du substratum.

La pomme de terre glycinée semble moins favorable à la culture de *B. caëlicolor* et à la production de son pigment, que la pomme de terre non glycinée.

Carotte. — *Betterave.* — *B. caëlicolor* se développe sur carotte et sur betterave mais n'y produit pas de coloration bleue.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Sur bouillon *B. caëlicolor* se développe mal. Il ne donne pas de voile, mais seulement un trouble uniforme.

En utilisant du bouillon de pigeon glucosé, MULLER a obtenu des colle-rettes à la surface du liquide. De celles-ci partaient des filaments descendant jusqu'au fond du tube.

Lait. — Le lait semble assez peu favorable au développement de *B. caëlicolor*. La coloration bleue n'apparaît parfois qu'après dix jours de culture, quelquefois le troisième ou le quatrième jour. Elle s'étend jusqu'à 1 cm. au-dessous de la surface et donne dans la suite une coloration jaune brun qui ne peut régénérer la coloration primitive par agitation du tube. L'intensité de la coloration varie avec les différents essais sur lait. Peu

à peu le lait s'éclaircit, se peptonise mais on n'observe pas de coagulation même à 30° C.

INDOL

En milieu peptoné comme en bouillon *B. caëlicolor* produit de l'indol.

POUVOIR FERMENTATIF

B. caëlicolor fermente le saccharose, le levulose, le dextrose. Il attaque la glycérine. Après le rougissement des milieux sucrés additionnés de tournesol on observe un bleuissement.

B. caëlicolor n'attaque pas l'arabinose, la dulcité, la mannite, le galactose, le maltose, le lactose, le raffinose, la dextrine, l'inuline et l'amidon soluble.

Sous l'action de *B. caëlicolor* l'hémoglobine ne change pas de couleur et n'est pas décomposée d'où la non formation de halo entourant les colonies développées sur plaque de sang gélosé.

PIGMENT

La formation du pigment est sous la dépendance du milieu et de la température.

MULLER fait remarquer que la colonie de *B. caëlicolor* est moins colorée que le substratum. Il en conclut que la Bactérie ne produit pas elle-même son pigment car dans ce cas la colonie devrait en contenir la plus grande partie. Il suppose au contraire que *B. caëlicolor* sécrète une substance chromogène qui, réagissant sur des constituants déterminés du substratum, donnerait une coloration bleue.

Propriétés. — Ce pigment a été appelé amylocyanine, par REINER MULLER. Il est bleu ciel, soluble seulement dans l'eau, les milieux aqueux et l'alcool faible. Il est insoluble dans l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone, l'alcool amylique, la benzine, l'éther de pétrole, le xydol, le terpinol. Le résidu bleu foncé, obtenu en évaporant une solution aqueuse à 60 °C. sous une pression de 50 cm. de Hg, se dissout immédiatement dans l'eau, mais au contraire très lentement dans la glycérine. Cette faible solubilité du pigment dans la glycérine serait due d'après MULLER à la présence d'une certaine quantité d'eau dans la glycérine utilisée.

On ne peut obtenir ce pigment cristallisé; c'est ainsi qu'en employant

la méthode de RUMPLER (1) pour les substances difficilement cristallisables, il n'a pas été possible à REINER MULLER de faire cristalliser l'amylocyanine. Ce pigment résiste à un chauffage prolongé à 60° C mais se décolore à 100° C. Il se décolore de même lorsqu'on le traite par l'eau oxygénée.

Les acides le font virer au rouge, les alcalis au vert. LEHMANN a retrouvé ce pigment chez *Bact. anthocyaneum* isolé de l'eau du Main. C'est de même le pigment des *Actinomyces*.

Si l'on traite une solution aqueuse d'amylocyanine par une quantité égale de glycérine, d'alcool absolu ou d'acétone, ou si l'on sature la solution par le chlorure de sodium on n'observe pas de changement notable dans la coloration.

En additionnant la solution aqueuse de chlorure de sodium, de chlorure de baryum, de chlorate de potassium, d'iodure de potassium, d'azotate de baryum, d'azotate de strontium, d'acétate de potassium, d'acétate de plomb, de thymol, MULLER n'a obtenu aucun changement de coloration.

Il n'a pu obtenir la matière colorante sèche qu'en évaporant la solution aqueuse à basse pression. Il a essayé de l'isoler par défécation par le nitrate mercurieux, le sulfate mercurique, l'acétate tribasique de plomb et a obtenu des flocons verts. Avec le chlorure de zinc, le chlorure d'étain, le chlorure de sodium il a obtenu un précipité de flocons rouges.

MULLER a essayé d'absorber l'amylocyanine par le charbon animal. Il a obtenu une absorption complète. Par contre la craie pulvérisée ne fixe pas le colorant.

La décoloration du pigment ne commence qu'à l'ébullition. A 60° C MULLER ne pouvait décolorer son pigment même par chauffage prolongé. L'eau oxygénée et le perhydrol de Merck décoloraient très rapidement (en quelques heures) l'amylocyanine ainsi que la solution N de potasse et la solution N d'acide acétique (en 24 heures).

Les corps avides d'oxygène tels que l'essence de térébenthine en couche assez épaisse, superposés à la solution aqueuse d'amylocyanine, décoloraient celle-ci en quelques jours.

MULLER n'a pu obtenir la décoloration de l'amylocyanine dans une atmosphère raréfiée d'oxygène par le vide (pression de 20 mm. de Hg). En traitant le pigment de *B. caëlicolor* par les acides chlorhydrique, sulfurique, acétique, citrique, salicylique, MULLER a fait virer le pigment du bleu au

(1) *Berichte der Deutsch. Chem. Gesell.*, Bd. XXXIII, 1900, p. 34 à 74.

rouge. En prolongeant l'action des réactifs il a obtenu une coloration jaune clair ou une décoloration complète.

Il a pu provoquer l'apparition d'une coloration rouge, persistant durant plusieurs jours, par addition d'alun, de sulfate de chaux, de sulfate de magnésie, de sulfate de zinc, de chlorure de strontium, de chlorure de lithium, de chlorure de magnésie, de chlorure de manganèse, d'azotate de chaux, de bi-phosphate de chaux.

Cette coloration rouge vire au vert avec les alcalis tels que la potasse et la soude. Mais ceux-ci produisent au bout de quelque temps une décoloration. La couleur verte obtenue par addition de chlorure, de sulfate, de nitrate de mercure, de borax, de tartrate neutre de potasse, d'acétate de plomb est très fixe.

La coloration bleue n'est pas modifiée par agitation de la solution avec le chloroforme, l'éther, la benzine, le xylol. Il est à remarquer que le xylol permet de la conserver pendant un mois.

MULLER n'a trouvé que deux substances qui soient analogues à l'amylocyanine au point de vue de leurs réactions.

L'une la syncyanine du lait bleu est insoluble dans tous les solvants autres que l'eau et la glycérine (THUMM), mais elle ne rougit pas par addition d'acide et ne verdit pas par action des alcalis. L'autre est un pigment sécrété par le *Micrococcus cyaneus*, qui donne d'abondants enduits bleu cobalt. Cette matière colorante est seulement soluble dans l'eau et présente des virages analogues à ceux du tournesol, avec les alcalis et les acides.

Dans ses travaux MULLER tend à rapprocher l'amylocyanine, de l'anthocyanine « *Blumenblau* » (bleu des fleurs) qu'on trouve dans les feuilles des végétaux supérieurs. L'amylocyanine présente d'ailleurs des réactions légèrement différentes de celles de l'anthocyanine.

A ce sujet, nous renvoyons le Lecteur aux remarquables publications faites par GUILLIERMOND sur la formation des pigments anthocyaniques (1).

(1) *Recherches cytologiques sur les pigments anthocyaniques et les composés oxyflavoniques*: A. GUILLIERMOND, — *Revue générale de Botanique*, Tome 46, 1934.

BACILLUS LACMUS Schrötter 1889

Ce germe appelé encore Bacille tournesol a été observé à Breslau, dans les serres du jardin Botanique. Il a été signalé pendant plusieurs années dans les bâtiments du jardin Botanique d'Eichborn. Il se développerait à la faveur de l'humidité et à Breslau on aurait constaté son existence surtout en automne et en hiver sur des travées fraîchement peintes avec une couleur à l'huile. Il a été décrit par SCHRÖTTER en 1889 et par TONI et TREVISAN la même année.

MORPHOLOGIE

Le germe est constitué par des cellules cylindriques de $4\ \mu$ de long sur $0\ \mu\ 6$ de large.

CARACTERES DE CULTURE

Ce germe difficilement cultivable n'a pas fait l'objet d'études approfondies. L'oxygène de l'air de même que la sécheresse de l'atmosphère diminueraient considérablement l'intensité du pigment sécrété par ce germe.

PIGMENT

B. lacmus donne un pigment bleu violet pâle ou rose rouge en cercles concentriques dans les colonies. Les colonies bleu violet virent au rouge sous l'action de l'acide acétique et au bleu sous l'action de l'ammoniaque.

B. CÆRULEUS Smith 1887

B. CÆRULEUS Voges 1893

Sous le nom de *B. cæruleus* il a été décrit trois germes qui présentent certaines analogies ; deux doivent être néanmoins distingués l'un de l'autre, ce sont *B. cærelus* VOGES, et *B. cæruleus* SMITH (1).

Nous étudierons donc ces deux germes dans un même paragraphe, nous réservant à la fin de cet examen de donner un tableau indiquant les principaux caractères susceptibles de les différencier.

SYNONYMIE

Bacillus cæruleus VOGES a été aussi appelé *Bacterium cæruleum* (VOGES), LEHMANN et NEUMANN, *Pseudomonas cærulea* (VOGES), MIGULA 1900, *Chromobacterium cæruleum* (VOGES), BERGEY 1923.

Le germe décrit par VOGES en 1893 avait été isolé des eaux souterraines de Kiel.

B. cæruleus SMITH appelé encore *Bacterium cæruleus* (SMITH) MIGULA 1900 a été découvert en 1887 par SMITH dans les eaux de la rivière de Schuylkill.

MORPHOLOGIE

C'est un bacille mesurant $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 4$ de long et $0\ \mu\ 8$ de large (VOGES). D'après SMITH il aurait $2\ \mu$ à $2\ \mu\ 5$ de long sur $0\ \mu\ 5$ de large

MOTILITE

Il est animé d'un mouvement de translation très rapide. Ce mouvement est dû d'après KRUSE à la présence d'un cil polaire. Ce cil, mis en évidence par la méthode de LOEFFLER est environ trois fois plus long que le Bacille et présente de deux à trois spires plus ou moins serrées.

La motilité est surtout marquée dans les cultures en bouillon à 20° C. et âgées de 24 heures ; petit à petit, cette motilité décroît.

(1) En 1886 ROSENBERG a décrit sous le nom de *B. cæruleus*, un germe paraissant identique à celui décrit par VOGES en 1893.

MODE DE GROUPEMENT

En effectuant des préparations à partir de cultures sur gélatine, VOGES a observé que le mode de groupement était très irrégulier. La plupart du temps on voit des Bacilles courts groupés en petits amas réguliers; quelquefois ils sont isolés et dans ce cas ils paraissent plus longs, ou bien ils forment de très courtes chainettes. Jamais on n'observe de formes sinueuses.

COLORABILITÉ

B. cæruleus (VOGES) ne prend pas le Gram Il se colore en bleu par la méthode de ZIEHL NEELSEN, et prend les couleurs d'aniline.

STRUCTURE

A l'examen microscopique VOGES n'a pas vu de noyau. Il a remarqué que les Bacilles poussant à la surface d'un tube de bouillon étaient colorés tandis que ceux qui vivaient en profondeur se trouvaient être incolores.

D'après SMITH, *B. cæruleus* présenterait de nombreuses formes d'involution en virgule (sous l'influence d'une élévation de température) ou en chaîne.

VOGES n'a pas pu mettre en évidence la présence de capsules, ni de spores tandis que SMITH conclut à la sporulation.

VOGES donne à l'appui de son affirmation, le fait qu'une culture chauffée à 60° C. pendant 15 minutes est tuée et ne pousse pas si on la réensemence. Il semble donc que SMITH ait pris des grains de pigment pour des spores.

RÉSISTANCE

La résistance de *B. cæruleus* est assez grande, soit en suspension dans l'eau de conduite, soit dans l'eau distillée. Après quatorze jours le réensemencement donne de nombreuses colonies.

TEMPÉRATURE

B. cæruleus croît à 20° C. d'une façon relativement rapide. A 37° C. on observe encore une végétation sur gélose, mais on remarque que le pigment disparaît. D'ailleurs KRUSE (1896) affirme que la production de

pigment se fait sentir encore à 37° C. en employant divers milieux, sauf la pomme de terre.

AÉROBIOSE

Il semble que la présence d'oxygène soit nécessaire à la vie de *B. coeruleus*. Une culture en piqûre sur gélatine ne se développe pas si elle est recouverte de gélatine.

CARACTERES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélose. — En cultivant *B. coeruleus* sur gélose inclinée, VOGES a obtenu à 20° C. en trois jours, un léger enduit gris bleu, superficiel. A 37° C. la culture est plus rapide (30 h.), plus abondante, mais brillante et incolore. Il ne se produit jamais de pigment. Par contre cette culture repiquée et cultivée à 20° C. donne un enduit coloré.

Gélatine. — 1° En plaque. Sur gélatine en plaque *B. coeruleus* cultive dès le deuxième jour et donne de petits points gris, qui ont la dimension d'une tête d'épingle. Au bout de quatre jours, ils ont la grosseur d'un grain de chenevis. L'examen au faible grossissement révèle la présence de deux sortes de colonies.

Les colonies profondes ont des bords nets avec, à l'intérieur, de légers épaississements concentriques. On aperçoit une légère granulation de la surface de la colonie. Vers le cinquième jour les colonies gardent toujours leurs contours tranchants, mais prennent en même temps que des dimensions plus grandes, une teinte jaune sale avec de gros points sombres au centre de la colonie.

Les colonies superficielles montrent dès le troisième jour des granulations bleu sombre. Les bords sont nets, le centre est granuleux. Au bout de cinq à six jours, ces colonies s'étendent en surface et donnent des colonies semblables à celles du Bacille typhique. La teinte fondamentale est jaune sale, mais les points pigmentés sont beaucoup plus nombreux. La colonie garde des bords nets, mais s'élève au centre et prend un aspect en « montagne de glace ». En même temps que le pigment on voit apparaître une légère liquéfaction de la gélatine.

2° En piqûre. En cultivant ce germe en piqûre on obtient une culture dite en clou. La tête est gris bleu brillant et on remarque que la coloration va en diminuant petit à petit, en passant par le vert pour atteindre le gris. Ceci montre encore une fois que la production du pigment est sous la dépendance de l'oxygène de l'air.

La culture sur gélatine en strie, favorise la production de pigment. Par liquéfaction de la gélatine, la coloration bleue gagne le fond du tube. La gélatine de poisson est beaucoup moins favorable au développement de *B. coeruleus*.

Pomme de terre. — La pomme de terre permet d'obtenir des cultures très abondantes d'un bleu très foncé, presque noir. Cette production de pigment ne s'effectue pas à 37° C. En ajoutant une solution de 37 % de chlorure de calcium à la pomme de terre on a une culture très abondante. La coloration de la culture tire sur le brun violet.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Le bouillon est un milieu qui permet d'obtenir très rapidement une culture pigmentée. En 36 heures, il se forme un voile épais bleu qui n'augmente jamais d'importance. A 37° C. la culture est absolument semblable mais le pigment ne se produit qu'en très petite quantité.

Lait. — En cultivant *B. caeruleus* sur lait, on obtient une culture rapide. La couche de crème du lait est bleue, tandis que le fond du tube est incolore.

En opérant sur du lait tournesolé, on n'obtient aucun virage. Seule une légère décoloration se manifeste en huit jours.

H²S

VOGES a cherché à mettre en évidence à l'aide de papier au sous-acétate de plomb la production d'H²S. Il a obtenu au bout de huit jours un léger brunissement du papier. Mais cette production est très faible, car jamais on n'observe de dégagement gazeux.

PIGMENT

Extraction. — Le pigment peut être extrait des cultures de *B. caeruleus* par l'eau et l'alcool. On peut le précipiter de sa solution aqueuse par addition de benzine, d'éther de chloroforme.

ROSENBERG a extrait le pigment de *B. caeruleus* en traitant les cultures

par une solution chlorhydrique ou acétique. Il obtient ainsi une solution jaune vert avec l'acide acétique, vert clair avec un reflet bleuâtre avec l'acide chlorhydrique.

D'après SMITH et MIGULA le pigment se trouverait dans les cellules et ne se dissoudrait ni dans l'eau, ni dans l'alcool, ni dans les acides.

Propriétés du pigment. — On a tenté de solubiliser le pigment avec tous les solvants possibles: l'alcool absolu avec ou sans acide chlorhydrique, les acides sulfurique, chlorhydrique, azotique, acétique, le chlorure de calcium, la glycérine à chaud ou à froid additionnée d'acides variés (ROSENBERG, 1889). Quelquefois des produits de filtration colorés peuvent simuler une coloration, mais après un repos assez prolongé la pseudosolution laisse déposer une fine suspension qui existait dans le liquide.

Par des manipulations variées on obtient avec l'acide acétique un filtrat jaune ou vert qui ne peut pas cependant être considéré comme une solution.

En versant de l'acide chlorhydrique sur la pomme de terre, où le germe s'est développé, on obtient un dégagement de gaz carbonique qui recouvre la culture à l'état de mousse. L'acide azotique fumant modifie le produit coloré et le transforme en une masse jaune brunâtre. Ce produit est modifié par une solution d'iode dans l'iodure de potassium.

L'acide acétique glacial le colore plus en vert et moins en bleu. Il semble qu'un corps jaune soit dissout, mais la partie principale du produit colorant reste sur le filtre. Si la matière colorante de *B. caeruleus* se laisse dissoudre, ce qui est certain, c'est cependant en quantité très peu considérable.

La chaleur n'a pas d'influence.

La réduction par le zinc et l'acide acétique glacial ou l'acide acétique, chauffé pendant trois quarts d'heure, ne modifie pas le produit colorant et une petite masse placée entre deux lames porte objet et examinée au spectroscopie ne fait voir qu'une image lavée (effacée, délayée).

Examen spectroscopique. — L'examen spectroscopique des solutions acétique ou chlorhydrique du pigment de *B. caeruleus* n'a pas permis à ROSENBERG de trouver des raies d'absorption nettes. Il en a déduit que le pigment sécrété par ce germe est très peu soluble.

Pouvoir pathogène. — *B. caeruleus* n'est pas pathogène (SMITH, VOGES, MACÉ, MIGULA). Une souris ayant été inoculée avec 0 cc. 5 de suspension n'en a aucunement souffert.

Tableau de différenciation entre *B. caeruleus* VOGES et *B. caeruleus* SMITH

	<i>B. Caeruleus</i> SMITH	<i>B. Caeruleus</i> VOGES
Taille	1 μ - 1 μ 4 sur 0 μ 8	2 μ - 2 μ 5 sur 0 μ 5
Association		chaînnettes souvent filaments
Motilité	mobile monotriche (polaire)	mobile
Gélatine	liquéfaction le 3 ^e jour	liquéfaction lente
Pomme de terre..	bleu gris, puis bleu noir	bleu, puis bleu noir
Pigment	soluble dans eau et alcool	insoluble dans eau et alcool
Spores	présence de spores	pas de spores

L'étude comparative de ces caractères montre qu'il existe une légère différence entre ces deux germes, surtout en ce qui concerne la taille, le pouvoir protéolytique vis-à-vis de la gélatine, la solubilité du pigment dans l'eau et l'alcool et la présence ou non de spores.

B. PAVONINUS Forster 1899

Ce germe a été étudié par KRAAL sous le nom de *B. pavoninus* FORSTER, en 1899, puis à la même date par BOWHILL THOMAS. Il avait déjà fait l'objet de recherches antérieures par Van der SLEEN.

MORPHOLOGIE

B. pavoninus donne des colonies luisantes, opaques, bleues par transparence. Celles-ci incolores au centre sont bleues à la périphérie comme s'il fallait beaucoup d'air pour assurer la chromogénèse. Ce germe présente une culture très abondante.

B. pavoninus est immobile et ne prend pas le Gram.

Il ne liquéfie pas la gélatine, ni le sérum.

Son besoin d'oxygène est assez limité puisqu'il peut se développer dans le canal d'inoculation des cultures en piqure.



B. INDIGONACEUS Claessen 1890

(INDIGOBLAUER B.)

Bacillus indigonaceus appelé encore *Indigoblauer B.*, *B. berolinensis indicus* par VOGES, FRANKLAND et GERMANO, *Bacillus indigoferus* par ZIMMERMANN, *Bacillus cœruleus* par CLAESSEN est étudié aussi sous le nom de *Bacillus indigogenus* ALVAREZ 1887, Bacille bleu indigo, *Bacterium indigonaceum*, *Pseudomonas berolinensis* (CLAESSEN), par MIGULA, Bacille de CLAESSEN.

Il fut étudié par CLAESSEN en 1890, sous le nom de *Bacillus cœruleus*. FLUGGE le décrit sous le nom de *Indigoblauer B.* comme MACE, FRANKLAND, ROUX, LUSTIG. En 1894, ZIMMERMANN lui donne le nom de *B. berolinensis indicus*. En 1900 MIGULA l'appelle *Pseudomonas berolinensis*.

Ce Bacille fut isolé des eaux de la Sprée avant filtration, par l'Institut d'Hygiène de Berlin.

MORPHOLOGIE

C'est un Bacille arrondi aux pôles, de la dimension du Bacille typhique (?), se développant soit en éléments isolés, soit en éléments réunis par deux ou trois.

ZIMMERMANN (1894) a remarqué que souvent deux articles réunis se séparaient au moment de la sporulation.

LEHMANN et NEUMANN (1899) ont obtenu en cultivant *Bacillus indigonaceus* sur pomme de terre une grande variété de formes : soit des Bacilles courts, soit des Bacilles longs et droits à bouts arrondis, soit des formes incurvées en C, en S, en U ou en N, ou le plus souvent des formes spiralées comprenant plusieurs tours de spire.

Ces auteurs ont observé aussi sur pomme de terre des chaînettes sinueuses formées de plusieurs éléments de taille et d'aspect différents.

On observe encore sur sérum gélatiné maltosé et sur pomme de terre, outre des Bacilles et des formes sinueuses, un grand nombre de petits corps bleu indigo ou bleu très foncé.

Les éléments isolés ont une longueur de $1\ \mu$ 6 à $3\ \mu$ de long d'après LEHMANN et NEUMANN. Les éléments associés peuvent atteindre une longueur de $4\ \mu$ 3. La largeur est d'environ $0\ \mu$ 8 pour les Bacilles sporulés ou non.

MOTILITÉ

D'après les observations de LEHMANN et NEUMANN, *B. indigonaceus* serait immobile et dépourvu de cils. Par contre, les types étudiés par VOGES, ZIMMERMANN, MACE, CLAESSEN, sont très mobiles. Suivant ZIMMERMANN ce Bacille serait animé d'un mouvement rotatoire. Ce mouvement serait d'ailleurs sous la dépendance du milieu. *Bacillus indigonaceus* étudié par THIRY est tantôt immobile, s'il est cultivé sur sérum gélatiné et maltosé, tantôt très mobile et progressant suivant une ligne brisée en M très régulière à l'aide d'oscillations rapides. L'observation de G. THIRY expliquerait les contradictions ci-dessus.

MODE DE GROUPEMENT

On trouve dans les cultures en goutte pendante des éléments isolés ou associés par deux ou trois. Sur pomme de terre l'aspect est tout différent. Les Bacilles sont groupés en chaînettes de plusieurs germes.

COLORABILITÉ

La colorabilité de *B. indigonaceus* est assez faible. D'après ZIMMERMANN il se colore en rouge par la méthode de Gram. La décoloration est rapide et complète.

B. indigonaceus se colore en rouge par la méthode de CLAUDIUS.

Il se colore en bleu par la méthode de ZIEHL NEELSEN.

STRUCTURE

B. indigonaceus n'a pas de noyau nettement différencié. On observe par contre certains éléments présentant de fines granulations; d'autres ont des granulations beaucoup plus grosses dont le diamètre peut atteindre toute la largeur du bâtonnet. Dans ce cas le nombre de ces granulations peut s'élever jusqu'à huit, mais souvent il n'y a qu'un ou deux grains par plasmide. L'emplacement occupé par ces granulations est d'ailleurs très variable.

D'après CLAESSEN *B. indigonaceus* est entouré de protoplasme, qui ne se colore qu'après avoir été soumis à l'action du mordant. Celui-ci est de l'encre de noix de galle.

LUSTIG admet la présence d'une capsule protoplasmique, mais cependant quelquefois, au lieu d'une fine ligne rouge qu'il observe après coloration à la fuchsine phéniquée, il voit seulement une large auréole.

REPRODUCTION

B. indigonaceus se reproduit par division et par sporulation.

SPORULATION

Au moment de la sporulation deux Bacilles réunis se séparent (ZIMMERMANN).

D'après VOGES, au moment de la sporulation, les bâtonnets ne sont pas colorés, ce qui les distingue de *B. indigoferus* de VOGES.

ZIMMERMANN décrit dans le milieu d'une plastide une spore allongée difficilement colorable par la méthode de NEISSER et ERNST, mais malgré tout bien distincte des autres parties.

CARACTÈRES DE CULTURE

La culture de *B. indigonaceus* s'effectue dans les meilleures conditions à la température du laboratoire, qui est d'ailleurs la plus favorable à la croissance et à la production du pigment.

A 30° C., *B. indigonaceus* ne se développe que lentement (ZIMMERMANN); d'après VOGES il pousserait encore faiblement à 37° C. mais sans donner de pigment. Pour les autres auteurs *B. indigonaceus* ne se développe pas à 37° C. sur divers milieux. Le développement de la Bactérie est arrêté mais celle-ci n'est pas tuée; en effet, une culture ayant séjourné à 37° C., remise ensuite à la température ordinaire croît normalement.

D'après ZIMMERMANN, *B. indigonaceus* est un aérobie strict.

Il paraît assez sensible à la réaction des milieux de culture. Dans les milieux acidifiés ou alcalinisés on n'observe pas de pigment (SCHNEIDER, 1895).

MILIEUX SOLIDES

Gélose peptone. — Avec l'âge, les cultures sur plaque de gélose offrent les couleurs suivantes: gris bleu après 12 heures, elles deviennent bleu indigo en 24 heures; au bout de quatre jours elles prennent une coloration violet sombre, bleu noir intense, analogue à la couleur du violet de mé-

thyle cristallisé ou du violet de gentiane avec de brillants reflets métalliques rouges cuivrés. Les colonies ont un aspect analogue à celui des colonies de Colibacille sur gélatine. Elles sont souvent plates, s'étendent en largeur, les bords restant très minces.

En cultivant *B. indigonaceus* en piqûre le développement est assez abondant même dans le canal d'inoculation, mais la culture reste incolore. Elle présente une structure dentelée et festonnée très élégante comme avec *B. indigoferus* provenant de la collection KRAAL.

La gélose fortement alcalinisée par l'ammoniaque permet une croissance intense.

Gélose peptonée glucosée. — Sur ce milieu on obtient une culture abondante, d'abord gris bleu, puis devenant peu à peu bleue avec des reflets métalliques cuivrés (rouges violacés).

Gélose peptonée maltosée. — Ce milieu semble moins favorable que le précédent. La gélose de SABOURAUD ne permet d'obtenir que de maigres cultures.

Gélose de Tochtermann. — On n'obtient qu'un enduit faible, grisâtre et humide et cependant les cultures sur gélose peuvent se couvrir de cristaux.

Gélose glucosée tournesolée. — *B. indigonaceus* ne fait pas fermenter le glucose. On observe des colonies bleues à reflets métalliques.

Gélose peptonée glycinée. — Sur ce substratum la croissance paraît assez faible au bout de 48 heures. La culture est incolore. Après huit jours les colonies sont nombreuses mais n'ont pas produit de pigment. Elles ont une couleur jaunâtre, plus foncée au centre qu'à la périphérie.

Gélatine. — Sur plaques de gélatine les colonies ressemblent à des colonies de Colibacille. La pigmentation n'apparaît que vers le quatrième jour, aussi bien pour les colonies superficielles que pour les colonies profondes (LUSTIG et MACÉ). D'après LEHMANN et NEUMANN les colonies peuvent ne pas être colorées et rester jaune mastic ou gris sale au lieu de bleu indigo ou de bleu à reflets.

La gélatine n'est pas liquéfiée qu'elle soit de forte ou de faible concentration.

a) *Pomme de terre additionnée d'acide minéral.* — Cultivé sur pomme de terre *B. indigonaceus* ne produit de pigment qu'en milieu acide. Cultivé à la température de 20° C. il donne parfois une légère culture bleu vert

en l'espace de 24 heures. Sur pomme de terre acide, il sécrète en trois ou quatre jours un pigment bleu indigo à reflets métalliques comme sur gélose.

b) *Pomme de terre additionnée d'acide lactique*. — La culture sur pomme de terre légèrement acidifiée par l'acide lactique (THIRY, inédit) est abondante; elle recouvre la plus grande partie du tubercule. Au bout de quinze à dix-sept jours on a un enduit vert olive, brillant granuleux. Le coton supportant la pomme de terre est coloré par endroits en bleu indigo.

c) *Pomme de terre additionnée d'alcali*. — En ensemençant *B. indigonaceus* sur pomme de terre ayant séjourné dans une solution de soude à 1 % pendant une demi-heure, on n'obtient pas la belle culture colorée observée sur pomme de terre acide. Dans ces conditions le développement est très lent, s'arrête au bout de peu de temps; l'enduit est mince, vert sale brillant et humide. Il prend un aspect gris bleu devenant légèrement vert pour aboutir après plusieurs jours au vert foncé. Autour de celui-ci le tubercule paraît se colorer en jaune quelquefois assez fortement, puis en vert sale, vert olive.

d) *Pomme de terre glycinée*. — En deux jours à la température de 27° C. la culture est d'un beau bleu. Le tubercule semble teinté en jaune vert ou un peu bleu et au bout de quelques jours devient bleu indigo ou gris bleu ou bleu verdâtre. Le coton imbibé d'eau se colore en jaune clair ou jaune serin.

Carotte. — La culture obtenue est d'un bleu noir, brillant à reflets métalliques, envahissant peu à peu la carotte. Au bout d'un mois l'enduit croît encore, mais surtout en épaisseur.

Sérum coagulé. — On obtient sur ce milieu une culture abondante, colorée en bleu indigo.

Sérum gélatiné. — *B. indigonaceus* ne liquéfie pas le sérum gélatiné malgré un développement abondant.

Sérum maltosé. — 24 heures après l'ensemencement on observe une légère coloration bleue donnant après quelques jours une strie muqueuse gris bleu, devenant violette, puis bleue très foncé.

Si on fait plusieurs passages sur sérum maltosé on obtient des colonies rondes les unes bleues, les autres gris bleu en 18 heures. Il est à remarquer que *B. indigonaceus* pousse mieux sur sérum maltosé que sur gélose maltosée.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon peptoné. — Un tube de bouillon peptonéensemencé avec *B. indigonaceus* se trouble en 24 heures. On observe au fond du tube un dépôt floconneux épais, gris, parfois légèrement rouge orangé, puis le liquide devient clair avec une collerette bleuâtre à la surface (ZIMMERMANN).

CLAESSEN n'a pas constaté l'existence de pigment dans ce milieu liquide. LEHMANN et NEUMANN auraient observé la formation d'un voile dont l'existence a été niée par KRUSE. D'après CLAESSEN la culture à 37° C. serait à peine trouble.

Partant d'une souche provenant de la collection de KRAAL, THIRY a obtenu sur bouillon (peptoné à 2 %) à la température ordinaire, un développement tout d'abord lent et peu abondant. Au bout de quelques jours apparaissait un léger voile cireux qui prenait en l'espace d'une semaine un aspect « *mesenteriforme* ». Sur les parois du tube on remarquait de nombreux cristaux incolores.

Dans les vieilles cultures on peut observer un dépôt, soit lourd et s'élevant en vrille par agitation, soit très léger et présentant un aspect floconneux et filamenteux. Dans tous les cas le milieu de culture est visqueux.

Bouillon de cheval (non peptoné, mais de réaction acide). — En cultivant *B. indigonaceus* sur un tel milieu non neutralisé, on obtient une culture abondante. Le liquide se trouble uniformément et un dépôt jaunâtre se sédimente peu à peu en même temps qu'apparaît en surface une légère collerette blanchâtre, pointillée par endroits de bleu indigo. On n'observe pas de voile.

Solution peptonée. — En solution de peptone alcalinisée à 5 % on obtient au bout de 24 heures une culture légère. Après cinq jours un dépôt se forme et le trouble augmente. On n'observe pas de pigment.

Solution peptonée (1 %) + saccharose (3 %) + craie. — Sur un tel milieu *B. indigonaceus* se développe lentement à 20° C. Le milieu se trouble de façon uniforme et il y a formation d'un dépôt visqueux s'élevant en vrille par agitation. On ne constate pas de voile ou de collerette à la surface du liquide. A 20° C. ou 37° C. il ne se produit aucune fermentation.

Les milieux liquides renfermant 1 % de peptone et 3 % de glucose ou de glycérine ne permettent pas au germe de se développer.

Lait. — LEHMANN et NEUMANN ont remarqué que *B. indigonaceus* ne

coagulait pas le lait, par contre il produisait dans ce milieu une coloration bleu verdâtre; l'addition de carbonate de calcium ne modifie pas sensiblement l'aspect des cultures que nous venons de décrire.

Liquide d'ARNAUD et CHARRIN. — *B. indigonaceus* ensemencé sur ce milieu fournit un développement léger au bout d'une semaine sans donner de coloration.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Milieu synthétique LI. — Après deux jours d'ensemencement sur milieu synthétique I de LASSEUR, *B. indigonaceus* produit soit des flocons filamenteux, soit un trouble uniforme.

Gélose asparaginée (gélose + milieu LI). — Sur gélose additionnée de liquide synthétique LI, ce germe fournit de belles stries muqueuses transparentes, visqueuses et adhérentes à la gelée.

Milieu au riz de SCHNEIDER (1895). — Sur ce milieu alcalin il se forme des colonies isolées de la taille d'un grain de sable de couleur indigo bleu. Les environs de la colonie sont colorés en vert olive ou bien le développement est incolore.

INDOL

Les auteurs ne seraient pas d'accord sur la fonction indologène de *B. indigonaceus* admise par certains, niée par d'autres.

H²S

B. indigonaceus ne dégage pas d'hydrogène sulfuré dans les milieux de culture.

PIGMENTS

La production du pigment est sous la dépendance d'un grand nombre de facteurs.

C'est sur pomme de terre glycinée, sur gélatine et sur gélose que *B. indigonaceus* fournit la plus grande quantité de pigment; mais ces milieux doivent être neutralisés à environ pH = 7 car le pigment bleu n'apparaît ni en milieu acide, ni en milieu alcalin (LASSEUR, inédit). D'autre part, celui-ci ne diffuse pas hors de la colonie dans le milieu nutritif sur lequel le germe se développe.

Propriétés du pigment. — Le pigment bleu indigo est soluble dans le chloroforme (à froid ou à chaud), le sulfure de carbone, l'alcool absolu, (froid ou bouillant), l'alcool éther (1 p. éther + 1 p. alcool), l'eau à la température ordinaire ou à l'ébullition.

Il est légèrement soluble d'après CLAESSEN et ZIMMERMANN dans une solution de soude. Il se dissout dans l'acide sulfurique concentré en donnant une solution jaune brun. En milieu chlorhydrique concentré et à froid on obtient un liquide bleu indigo ne restant bleu que 5 minutes, car il devient rapidement jaune brun clair au contact de l'air. Si on emploie l'acide azotique comme solvant le produit obtenu est jaune « *couleur vin du Rhin* » à chaud et il est stable au contact de l'air.

Réactions. — Une solution chlorhydrique bleu indigo additionnée d'ammoniaque perd sa coloration. Celle-ci est régénérée lorsque la solution est de nouveau acidifiée et abandonnée à l'air.

Le pigment se décolore rapidement sous l'action de l'eau de chlore. Traité par de la potasse il devient bleu verdâtre. L'acide acétique est sans action sur lui.

BACILLE BLEU INDIGO DE LUSTIG 1893

MORPHOLOGIE

LUSTIG a décrit en 1893 sous le nom de Bacille bleu indigo un germe présentant des extrémités arrondies de dimensions identiques à celles du Bacille typhique, qui cultivé en goutte pendant apparaissait sous forme d'un filament constitué par deux ou plusieurs plastides. Le Bacille bleu indigo serait doué de motilité.

COLORABILITÉ

Se colorant facilement à l'aide de la fuchsine phéniquée, il paraîtrait d'après LUSTIG entouré d'une capsule. Le mordantage effectué avec une solution de tanin, puis une coloration ultérieure à l'aide de fuchsine phéniquée met en évidence, à l'examen microscopique, une ligne fine rouge, épousant à quelque distance les contours du microorganisme, lui-même fortement coloré.

CARACTERES DE CULTURE

Gélose. — Ensemencé sur des tubes de gélose ce Bacille donne en 24 heures des colonies bleu indigo devenant violettes au bout de quatre jours.

Gélatine. — Sur plaques de gélatine LUSTIG a obtenu en trois jours des colonies grises, rondes, qui 24 heures après présentaient la pigmentation caractéristique. Ce savant n'a pas observé de liquéfaction.

Ensemencé en piqûre sur gélatine ce Bacille fournit en 24 heures une colonie qui devient bleue et s'étend sur toute la surface de la gélatine.

Pomme de terre. — Trois à quatre jours après son ensemencement sur pomme de terre le Bacille bleu décrit par LUSTIG donne une culture fortement colorée. La coloration se produirait mieux en milieu acétique.

Bouillon de viande. — Cultivant son Bacille bleu sur bouillon de viande LUSTIG n'a pu constater de pigmentation : un trouble se produisait seulement en 24 heures ou même 48 heures, en même temps que de gros flocons se sédimentaient.

TEMPÉRATURE

Ce Bacille se développe facilement à la température ordinaire. Par contre à 37° C. la multiplication est fortement ralentie.

En comparant ses caractères à ceux de *B. indigonaceus*, il semble que le Bacille bleu indigo signalé par LUSTIG est sensiblement identique à *B. indigonaceus*.

B. INDIGOFERUS Voges 1893

B. indigoferus O. VOGES. *Pseudomonas indigoferus* (Voges) MIGULA.

B. indigoferus fut isolé en 1893 par O. VOGES des eaux de conduite de la ville de Kiel. Ce Bacille étudié par THIRY en 1898 venait des collections KRAAL.

MORPHOLOGIE

B. indigoferus est un germe dont les éléments sont colorés par le pigment. Les plastides mesurent $1\ \mu$ 8 de long et $0\ \mu$ 6 de large. Leurs extrémités sont coupées nettement. Le corps bactérien est généralement droit mais on observe parfois une très légère courbure.

Coloration naturelle. — Sur culture en bouillon de six jours VOGES a remarqué que le voile bleu, se formant à la surface, était constitué en grande partie par des Bacilles dont le contenu était nettement coloré en violet bleu. Cette coloration n'était pas uniforme car dans ces éléments on note la présence de plages colorées, ne présentant pas de structure très particulière, à côté de plages incolores fortement réfringentes au nombre de deux à trois par plastide. Certaines plastides peuvent être complètement incolores ; dans ce cas elles montrent un contenu ne présentant pas de différenciation.

MOTILITÉ

Les plastides de *B. indigoferus* sont animées d'un mouvement de rotation rapide. Cultivées durant 24 heures en goutte pendante sur bouillon, elles se déplacent très rapidement. La motilité peut persister durant huit jours.

Le Bacille étudié par THIRY était animé de mouvements très vifs, comparés à ceux de la souche isolée par VOGES.

La motilité s'atténue avec le temps et au bout de huit jours, il n'y a plus que la moitié des germes qui sont mobiles. Le bouillon, la betterave, la pomme de terre acide, donnent des cultures constituées par des germes très mobiles. Il n'en est pas de même sur la gélatine où la motilité est beaucoup moindre. Bien que l'eau de conduite distillée et stérilisée ne soit pas très toxique pour *B. indigoferus* elle lui fait néanmoins perdre sa motilité.

Organes de mouvement. — VOGES a réussi grâce à la méthode de LOEF-

FLER à mettre en évidence chez *B. indigoferus* la présence d'un fouet polaire. Le fouet est environ trois fois plus long que le germe lui-même. Il présente deux à trois tours de spire.

MODE DE GROUPEMENT

Les plastides de *B. indigoferus* sont groupées par deux. D'après ZIMMERMANN, la longueur des éléments bactériens pourrait atteindre 4μ 3 de long sur 0μ 8 de large. Sur pomme de terre les Bacilles sont flexueux et plus longs.

Au moment de la sporulation les deux bâtonnets accolés se séparent. Dans la plupart des cultures cependant on rencontre surtout des éléments isolés présentant un seul fouet polaire.

COLORABILITÉ

La colorabilité de *B. indigoferus* semble assez faible. D'après VOGES et ZIMMERMANN il ne prend pas le Gram; cependant THIRY a remarqué que certaines formes conservent leur coloration violette par la méthode de GRAM, tandis que d'autres sont colorées en rouge. VOGES colorait très facilement *B. indigoferus* par les colorants d'aniline.

SPORULATION

B. indigoferus se reproduit à l'aide de spores. Dans un bâtonnet provenant de la désagrégation d'un article, constitué par deux plastides, on voit apparaître une spore allongée, difficilement colorable par la méthode de NEISSER et ERNST; malgré cela elle est très visible du fait de sa réfringence (ZIMMERMANN).

TEMPÉRATURE

Pour la croissance et la chromogénèse, la température de 20° C. est la plus favorable (VOGES). A 29° C. les colonies apparaissent assez rapidement sur gélatine forte. A 37° C. on observe encore une culture mais elle ne produit aucun pigment. En repiquant *B. indigoferus* sur agar-agar à la température de 37° C. VOGES était arrivé à lui faire perdre pour quelques passages sa fonction chromogène. Le Bacille récupérait en effet sa pigmentation dès qu'il était ramené à la température de 20° C.

VOGES déterminant la température mortelle de *B. indigoferus* aurait trouvé que le *Bacille* était tué par chauffage à 60° C. pendant quinze minutes.

AEROBIOSE

Il semblerait que la présence d'oxygène libre ne soit pas nécessaire au développement de ce germe. Il n'en serait pas de même pour le pigment qui sur gélatine ne se produit que dans les colonies superficielles.

CARACTERES DE CULTURE

SUR MILIEUX SOLIDES

Gélose. — Sur gélose les colonies sont identiques à celles données par *B. indigonaccus*. De teinte gris bleu tout d'abord elles deviennent bleu foncé ensuite, produisant des plaques humides et grasses. La gélose de SABOURAUD ne permet qu'un faible développement.

Sur gélose glucosée au contraire, la culture est très abondante et colorée en gris bleu.

Sur gélose la souche étudiée par THIRY donnait des colonies mastic ne présentant aucun pigment.

Un milieu gélosé additionné d'ammoniaque donne des colonies d'un beau gris bleu. Celles obtenues sur gélose glucosée tournesolée sont gris sale et ne virent pas. La glycérine incorporée au milieu entrave le développement en même temps qu'elle empêche la production du pigment, contrairement à ce que l'on observe dans la production de nombreux pigments bactériens.

Gélatine. — La gélatine constitue un milieu nutritif particulièrement favorable à la culture de *B. indigoferus*. Les colonies apparaissent rapidement à 29° C. sur des gélatines à forte concentration.

Par ensemencement en plaques, on obtient au bout de 36 à 48 heures des colonies présentant des aspects différents : les unes profondes, de la grosseur d'une tête d'épingle ou d'un grain de chenevis, sont transparentes, incolores, avec une bordure brillante et nette ; les plus grosses d'entre elles sont teintées en un bleu très pâle. Les autres sont superficielles s'étendant rapidement à la surface. Elles sont transparentes, leurs bords sont bien nets et on aperçoit déjà de petites masses colorées en bleu, se réunissant en un

amas s'irradiant non seulement dans la colonie, mais encore dans la gélatine, tout en diminuant peu à peu de coloration.

Après quatre jours de culture les colonies profondes prennent une teinte jaune verdâtre sale, quelques masses pigmentaires ayant pénétré à l'intérieur de la gélatine.

Les colonies superficielles par contre prennent une teinte verte. Elles sont tachetées par de nombreux points bleus et entourées d'un cercle net d'un bleu très sombre. Au bout de six jours la gélatine est comme saupoudrée de petites pierres bleues, tandis que les colonies sont recouvertes d'un fin voile irisé.

En ensemençant sur gélatine en piqûre, VOGES a observé dès les premiers jours, la formation d'une colonie grise se développant rapidement. En même temps qu'il y a accroissement en profondeur, la colonie superficielle s'élève, formant une masse en tête d'épingle. Bientôt apparaît une coloration bleu sombre, présentant l'aspect d'un enduit brillant. Pendant ce temps les germes se développent dans le canal d'inoculation, tout en restant incolores.

Si on ensemece en strie, la culture se limite presque à la strie d'ensemencement, puis donne une culture bleu sombre, recouverte d'enduit brillant.

L'addition de potasse à la gélatine n'entrave pas le développement de *B. indigoferus*.

La gélatine de poisson semble peu favoriser la croissance de ce germe. Après huit jours de culture, on observe seulement une ligne bleu pâle, visible sur fond blanc.

Que *B. indigoferus* soit ensemençé sur gélatine alcaline, gélatine de poisson ou gélatine bouillon, il n'y a jamais liquéfaction du substratum.

Pomme de terre. — La pomme de terre constitue un milieu favorable au développement de *B. indigoferus*, qui donne dans ces conditions assez rapidement un enduit bleu vert. Souvent la masse culturale est brillante et présente des reflets métalliques. Le tubercule paraît se teinter en jaune.

La glycérine additionnée à ce substratum favorise la croissance de *B. indigoferus*. La masse microbienne se teinte en vert bleu ou gris bleu après deux jours de culture à 25° C. Le tubercule se colore en jaune serin. Au bout de huit jours la culture devient vert olive et le substratum nutritif jaune vert.

La pomme de terre salée ne donne pas de meilleurs résultats que la pomme de terre ordinaire.

Sur tubercule additionné de liquide de CHARRIN, le pigment produit est bleu vert.

Betterave. — La betterave paraît être un milieu plus favorable que la pomme de terre pour le développement de *B. indigoferus*, qui y donne des colonies rouge violacé à reflets métalliques. Le coton imbibé d'eau se colore en jaune. Sur betterave alcaline ou acide, le développement est lent, mais plus rapide néanmoins que sur pomme de terre. On observe de plus la formation de nombreux cristaux d'oxalate de chaux.

Carotte. — La carotte acide ne paraît pas favoriser la fonction chromogène. En trois jours à 20° C. il ne se produit qu'un développement très faible et légèrement bleuté.

Sérum. — La culture de *B. indigoferus* s'effectue facilement sur sérum gélatiné et maltosé. On n'observe pas de liquéfaction. Le pigment n'apparaît que sur sérum maltosé et cela d'une façon irrégulière.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — VOGES a constaté que *B. indigoferus* ensemencé sur bouillon donnait une culture très nette en 24 heures. Celle-ci présentait un voile très fin à la surface en même temps qu'un trouble léger et un dépôt floconneux grisâtre dans le fond du tube. Au bout de huit jours le voile se colore en bleu et l'examen d'un fragment de celui-ci entre lame et lamelle montre des Bactéries colorées. La culture de *B. indigoferus* en bouillon peut s'effectuer à 37° C., mais dans ces conditions la fonction chromogène disparaît.

Le bouillon de cheval acidifié et non additionné de peptone donnerait des résultats identiques à ceux obtenus avec *B. indigonaceus*, c'est-à-dire une culture rapide, trouble, avec un dépôt jaune, mais ne présentant pas de voile (G. THIRY).

Eau peptonée. — *B. indigoferus* se développe très lentement sur eau peptonée à 3 % préalablement alcalinisée. Si on ensemence sur eau peptonée, glucosée, saccharosée, glycinée, neutralisée par le carbonate de soude, la croissance est peu active et on ne constate pas de fermentation.

Lait. — VOGES cultivant *B. indigoferus* sur lait, soit à 37° C., soit à 20° C., n'a pas observé de coagulation et de peptonisation. Dans ces conditions, seule la crème est colorée superficiellement en gris bleu après trois

jours de culture à 20° C. Le lait ne se colore pas, même après agitation du tube et mélange de la crème. A 37° C., *B. indigoferus* ne donne pas de pigment sur ce milieu. Cette température n'entrave cependant pas la croissance.

Lait tournesolé. — Ensemencé sur lait tournesolé ce germe ne produit aucun virage après dix jours de séjour à 20° C. On note tout au plus une légère décoloration du tournesol.

Petit lait tournesolé. — Le petit lait tournesolé, qui constitue un milieu très favorable au développement de *B. indigoferus* ne subit de même aucune modification.

Nitrates. — D'après G. THIRY, *B. indigoferus* réduirait les nitrates en nitrites et cela d'une façon très importante en eau peptonée nitratée.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Sur le liquide d'ARNAUD et CHARRIN ce germe donne un léger trouble au bout de quelques jours.

Sur milieu synthétique LI, on observe après dix jours un trouble uniforme et la culture ne présente ni voile, ni flocons, ni dépôts.

H²S

VOGES n'a pu mettre en évidence la production d'H²S sur bouillon, en se servant comme réactif de papier au sous-acétate de plomb.

PIGMENT

Le pigment de *B. indigoferus* a, comme nous avons eu l'occasion de le voir, une origine intracellulaire. Il ne diffuse pas dans le substratum nutritif sur lequel se développe le germe. La fonction chromogène est sous la dépendance du milieu nutritif : la gélatine, la pomme de terre, la betterave étant des milieux particulièrement favorables pour la production du pigment de *B. indigoferus*.

La souche isolée par VOGES et celle étudiée par THIRY ne paraissent pas différer quant à leur fonction chromogène. VOGES a signalé combien la température de culture était un des facteurs influençant le plus la chromogénèse de *B. indigoferus*. La température de 37° C. lui avait permis d'obtenir des souches complètement achromogènes, qui n'étaient susceptibles

de retourner à la forme originelle qu'après une série de passages successifs sur de nouveaux milieux à la température de 20° C.

Propriétés du pigment. — Le pigment bleu vert, bleu indigo, bleu gris produit par *B. indigoferus* sur gélose, pomme de terre, betterave est soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme.

Une solution aqueuse traitée par l'acide sulfurique devient brune. Par l'acide azotique elle prend une teinte bleu foncé.

Sous l'action de l'acide chlorhydrique le pigment vire au vert; il revient à sa teinte bleue primitive après neutralisation de l'acide par l'ammoniaque.

Au contact de l'acide acétique le pigment bleu vert devient gris bleu et vire de nouveau au bleu par addition d'ammoniaque.

Il n'a pas été possible jusqu'ici d'obtenir à l'état cristallisé le pigment sécrété par *B. indigoferus*.

POUVOIR PATHOGENE

KRUSE a montré que *B. indigoferus* était dénué de pouvoir pathogène. Pour cela il inoculait à une souris 0 cm. 5 d'une culture jeune effectuée sur bouillon. Cet animal ne présentait aucun symptôme de maladie.

BACILLE DE GUNTHER ET SPITTA 1891

GUNTHER et SPITTA ont découvert ce Bacille le 18 juin 1891 sur une plaqueensemencée trois jours auparavant avec une eau de Berlin. Il se présentait sous la forme de trois colonies de couleur bleu de Prusse intense et foncé. Les observateurs n'ont pu étudier ce Bacille; les cultures sur gélatine en piqûre remises sur plaques sont restées absolument stériles et les cultures sur gélose et sur bouillon sont mortes au bout de quelques jours.

MORPHOLOGIE

Le Bacille de GUNTHER et SPITTA avait l'aspect sur gélatine de Bacilles grêles de taille moyenne, très mobiles en goutte pendante. Les plastides possèdent un fouet polaire.

CARACTERES DE CULTURE

Gélatine. — En piqûre sur gélatine le développement est visible au bout de peu de jours. Dans la piqûre la culture est blanche. A la surface il se forme un voile d'une couleur bleu foncé splendide, avec en certains points des reflets métalliques.

Gélose. — Sur géloseensemencée avec les cultures précédentes le Bacille donna à la température ordinaire un développement assez abondant gris et peu coloré en bleu. Mis à l'étuve à 37° C. il s'accrût de façon bien plus considérable qu'à la température ordinaire, mais le germe perdit sa fonction chromogène et les cultures restèrent incolores.

Bouillon. — Le Bacille de GUNTHER et SPITTAensemencé sur bouillon à la température de la chambre donna un trouble assez marqué.

BACTERIUM H. ROSENBERG B 1887

Ce Bacille a été trouvé dans les eaux du Main, où il est assez rare et peu constant. Il a été décrit en 1887, par ROSENBERG.

MORPHOLOGIE

Il se présente sous la forme d'un petit bâtonnet, de taille moyenne à extrémités arrondies. En goutte pendante, il se déplace dans le champ du microscope d'un mouvement rectiligne. Il présente des spores allongées placées au milieu du bâtonnet; ces spores par germination donnent de nouveaux filaments qui se divisent à leur tour.

CARACTERES DE CULTURE

Sur gélatine. — Le Bacille se remarque par la superbe couleur des colonies qu'il forme en surface. Ces colonies croissent très vite, elles ont des bords délicats, très minces, très fins, irrégulièrement dentelés. Elles sont d'abord gris mat, puis au bout de quelques jours, dans leur milieu se répand une coloration bleue qui fonce de plus en plus, en passant par toutes les nuances, entre le bleu ciel et le bleu noir le plus foncé. Au début la périphérie est moins colorée. Mais plus tard l'aspect est homogène et toute la surface est foncée. Dans le canal de la piqûre le développement est très faible, il n'y a pas de coloration dans la profondeur. A la surface se forme vite un entonnoir de liquéfaction qui lentement progresse vers le fond du tube.

Sur gélose. — Sur gélose la culture est absolument analogue à celle que nous venons de décrire. Quand la colonie bleue arrive aux bords du tube, ne pouvant plus s'étendre, elle donne de nombreux petits plissements. La matière colorante pénètre dans le milieu de plusieurs millimètres.

Sur pomme de terre. — Le Bacille croît très bien en donnant une coloration bleu foncé presque noir.

Sur milieux acides. — Le Bacille pousse assez bien.

PIGMENT

Le pigment bleu sécrété par *Bacterium* H. ROSENBERG B. est soluble dans l'eau.

CHAPITRE III

B. CYANEO-FUSCUS Beijerinck 1899

B. cyaneo-fuscus fut isolé en février 1888 d'un échantillon de colle forte colorée en noir, provenant d'une fabrique de gélatine de Delft.

Cette Bactérie fut retrouvée dans des fromages de Hollande où elle y cause une altération connue sous le nom de « bleu ». Mais l'habitat naturel de ce germe est l'eau et le sol.

BEIJERINCK a isolé *B. cyaneo-fuscus* à six reprises différentes. La première fois il obtint une culture mixte de ce germe en laissant séjourner dans de l'eau de conduite quelques racines de *Vicia faba*. L'infusion colorée obtenue contenait un germe donnant sur gélatine des colonies brun foncé, laissant diffuser une matière colorante bleue, et liquéfiant le substratum. Dans deux autres cas BEIJERINCK l'a isolé sur gélatine contenant de l'extrait de malt à partir de l'eau de lavage des cuves de fermentation d'une brasserie ou d'eau ayant traversé une conduite servant de véhicule à de la drêche fermentée.

Il l'a encore isolé de l'eau d'un canal fluvial à trois reprises différentes.

TECHNIQUES D'ISOLEMENT

BEIJERINCK a suivi une technique spéciale pour isoler *B. cyaneo-fuscus* à partir de fromage. Dans ce but il utilise un milieu préparé de la façon suivante :

100 cc. de lait de vache sont additionnés de présure en poudre et portés à 35° C. Après coagulation on décante et filtre le petit lait. Ce liquide transparent est additionné de 1 % de peptone, 1 % de glucose et 7 % de gélatine. On porte à l'ébullition pour dissoudre, on filtre et on stérilise. La réaction est amphotère par suite de la présence de phosphates formant tampon. Le milieu ainsi obtenu est coulé en boîtes de PÉTRI.

L'ensemencement est effectué à partir de fromage.

Une parcelle de la masse interne du fromage est alors écrasée avec une aiguille à la surface de la plaque de gélatine, puis étendue en stries. On

peut encore faire une émulsion dans de l'eau dont on arrose la surface de la plaque de gélatine.

Les germes susceptibles de se développer sur un terrain contenant du sérum de lait, apparaissaient au bout de quelques jours, soit dans les lignes d'inoculation, soit en colonies isolées.

Dans un grand nombre d'expériences BEIJERINCK a constaté qu'il y a présence de deux espèces de germes : une Levure du sucre de lait nommée *Saccharomyces tyrocola* et cinq sortes de ferments lactiques. Il ne lui a pas été permis de mettre en évidence *B. cyaneo-fuscus*. En partant de taches bleues d'un fromage altéré, il ne lui a pas été possible non plus de retrouver *B. cyaneo-fuscus*. Par contre les ferments lactiques s'y trouvaient en très grande quantité. Il explique cette abondance de ferments lactiques par l'action protéolytique intense de *B. cyaneo-fuscus* vis-à-vis de la caséine.

B. cyaneo-fuscus transforme d'abord la caséine en peptone, que les ferments lactiques utiliseraient par la suite pour leur nutrition, étant eux-mêmes incapables de s'alimenter directement à partir de caséine.

Les milieux de culture à base de caséine n'ayant favorisé que les germes accessoires, BEIJERINCK a utilisé des milieux sans caséine et sans peptone, ou tout au moins en contenant de très faibles quantités. C'est ainsi qu'il employa soit une solution de gélatine à 10 % pure dans de l'eau de canal sans addition d'autre matière, soit une solution de peptone à 0,50 %. Dans ces conditions *B. cyaneo-fuscus* se développait seul. De plus ayant remarqué que *B. cyaneo-fuscus* avait disparu des fromages vieux, BEIJERINCK s'adressa à des fromages frais et peu acides.

Ce Savant souligne la faible acidité des fromages utilisés, car *B. cyaneo-fuscus* est très sensible aux acides.

De cette manière il obtint des cultures presque entièrement constituées par *B. cyaneo-fuscus*. L'acidité du fromage utilisé correspondait tout au plus à 5 cc. de solution potassique normale pour 100 gr. de fromage.

L'abondance croissante de l'acide libre dûe à la transformation du sucre de lait par les Bacilles lactiques, cause la mort de *B. cyaneo-fuscus*. Ceci explique pourquoi les taches du fromage vieux donnent toujours un résultat négatif dans les essais de culture.

MORPHOLOGIE

Sur gélatine. — *B. cyaneo-fuscus* se présente sous la forme d'un bâtonnet de longueur variant de 0 μ 2 à 0 μ 3 de long. En milieu liquide

les plastides sont beaucoup plus petites : de $0\ \mu\ 3$ à $0\ \mu\ 6$ de long sur $0\ \mu\ 5$ de large.

C'est un germe mobile et strictement aérobie.

COLORABILITÉ

Les bâtonnets morts absorbent la matière colorante et présentent une teinte variant du brun verdâtre au brun noirâtre foncé.

B. cyaneo-fuscus réduit le bleu d'indigo soluble.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Une solution de gélatine à 10 % dans de l'eau de canal constitue un milieu favorable pour le développement de *B. cyaneo-fuscus*. Les colonies en s'accroissant liquéfient la gélatine avec une intensité plus ou moins grande, suivant que celle-ci contient plus ou moins de peptone et suivant le degré d'activité végétative des Bactéries elles-mêmes. A 6° C. et 10° C. il y a une forte liquéfaction de la gélatine (culture sur gélatine pure) et diffusion d'une matière colorante brune pure.

Le germe pousse mal sur aliment phosphaté même lorsque la dose de phosphate est de 0,10 à 0,20 %.

Lait. — Le lait bouilli ou non est un bon aliment. A basse température on obtient les mêmes pigments que sur eau peptonée à savoir : vert, puis bleu, brun et enfin noir brunâtre. Après un temps assez long le corps foncé s'oxyde aux dépens de l'oxygène atmosphérique. Le lait prend alors une teinte brune perceptible pendant des mois.

Les germes autres que *B. cyaneo-fuscus* causant l'infection première du lait arrivent par l'intermédiaire de l'eau ayant servi au nettoyage des ustensiles de laiterie.

Résistance. — Des bandelettes de papier filtre et des fils de soie chargés de culture de Bacille sont séchés puis placés en solution de peptone. Dans de telles conditions BEIJERINCK n'a pu revivifier le Bacille. Il a ainsi été obligé d'admettre que *B. cyaneo-fuscus* ne se trouve pas à l'état vivant dans les poussières de l'air. L'infection du lait doit toujours avoir pour point de départ des objets humides.

Les solutions étendues de corps albuminoïdes, telles que le lait additionné d'eau, longtemps abandonnées à elles-mêmes à basse température constitueraient probablement les premiers foyers d'infection.

ACTION ANTAGONISTE

Dans le Nord de la Hollande, on utilise dans les fabriques de fromages le petit lait dit filant (culture dans le petit lait d'un Microcoque « *mucipare* » de l'acide lactique), avec lequel on combat avec succès différentes maladies de l'industrie fromagère.

Le petit lait filant est encore utilisé pour améliorer considérablement les fromages atteints par la maladie des taches bleues.

L'action des Bacilles mucipares n'est pas encore bien expliquée, pas plus que n'est élucidé le problème de la maturation.

L'antagonisme vis-à-vis de *B. cyaneo-fuscus* dépend de deux facteurs :

1° de la production d'acide lactique ;

2° de l'absorption complète d'oxygène par l'immense quantité de Bactéries mucipares que l'on mêle avec la masse caséuse ; à 25 litres de lait employés pour faire un fromage on ajoute en même temps que la présure 1/2 litre de petit lait filant.

PIGMENT

B. cyaneo-fuscus est un germe chromopare excrétant une matière colorante brune diffusible.

Ensemencé sur peptone à 0,5 ou 2 % il donne une coloration d'un beau vert, soluble dans l'eau, accompagné d'une coloration bleu outre-mer due à des sphérîtes microscopiques solides.

Le pigment vert disparaît et fait place à un pigment brun, gris noir, brunâtre foncé. Les sphérîtes bleus peuvent se changer en corpuscules brun foncé ou même noirs, mais ils sont plus résistants à cette transformation.

Propriétés du pigment. — L'acide nitrique, l'acide chromique, le peroxyde d'hydrogène décolorent la matière colorante ; l'air la décompose aussi, mais plus lentement.

Sphérîtes. — Pour obtenir des sphérîtes on utilise une solution de 1 à 3 % de peptone dans de l'eau de conduite que l'on stérilise par ébullition 3 fois répétée et que l'onensemence avec *B. cyaneo-fuscus*. La culture est abandonnée à une température de 10° C. et après quatre à cinq jours la couleur jaune pâle de la solution de peptone se change en couleur verte

surtout intense à la surface où l'air a librement accès. Peu de temps après commence la formation de sphérîtes, dont la matière colorante est évidemment un produit d'oxydation. Cette formation ne se montre que dans la pellicule surnageant le liquide, ainsi que dans un anneau touchant à un niveau un peu inférieur la paroi du vase de verre, là où se trouve le ménisque du liquide. L'anneau est d'un beau bleu à reflets d'or et persiste longtemps ; il est encore visible dans des cultures déjà assez âgées.

La couleur du liquide vire au noir puis au brun clair. Cette transformation atteint aussi l'anneau.

Les sphérîtes sont plus ou moins solubles dans les acides forts, d'autant plus facilement que le bleu est plus pur, d'autant plus incomplètement qu'elles sont de couleur plus noirâtre.

L'acide sulfurique est un bon dissolvant et donne une solution bleue qui bientôt devient violette et enfin se décolore. Pendant la dissolution on voit se former d'abord des aiguilles de gypse puis, semble-t-il, des prismes de tyrosine. Le gypse vient du carbonate de chaux se trouvant dans le liquide de culture et qui paraît s'accumuler dans les sphérîtes. Les autres cristaux identiques à de la tyrosine ont une provenance douteuse. Ils ne forment pas la base proprement dite des sphérîtes car celles-ci ne seraient pas solubles dans l'acide sulfurique.

L'hydrosulfite de sodium décolore complètement les sphérîtes et les sphérocristaux de matière colorante bleue. Les aiguilles cristallines du sphérocristal ont pour support un squelette constitué par un corps protéique.

Les sphérîtes se forment par accumulation de la matière colorante dans le corps des Bactéries en voie de dépérissement. La charpente est constituée par le protoplasme bactérien lui-même.

La matière colorante bleue rappelle à bien des points de vue le bleu d'indigo.

L'oxydation par l'acide azotique entraîne la production des mêmes nuances de couleur aboutissant au brun jaunâtre.

Les sphérîtes se laissent aussi peu dissoudre que le bleu d'indigo dans l'éther, l'alcool, le chloroforme froid ou bouillant. Ils se comportent de la même manière vis-à-vis des agents réducteurs.

Les cultures au maximum de végétation réduisent le bleu d'indigo mais au bout d'un temps assez long *B. cyaneo-fuscus* ne réduit pas son propre pigment bleu noirâtre.

BACILLE BLEU IV DE MACÉ 1898

Le Bacille bleu IV de MACÉ a été isolé par MACÉ en 1898 dans une eau provenant de Pont-Saint-Vincent (Meurthe-et-Moselle).

MORPHOLOGIE

C'est un Bacille assez grand, de taille irrégulière qui semble porter une spore ronde à chacune de ses deux extrémités. La forme de ce germe varie avec le milieu. C'est ainsi que se présentant dans les cultures jeunes sous forme de bâtonnets allongés de longueur sensiblement constante, il montre au contraire dans les vieilles cultures sur gélatine des formes de taille très variable : certains Bacilles offrent l'aspect de longues spirales filamenteuses, les autres sont des éléments assez courts. Tous présentent cependant des granulations bleuâtres.

Le Bacille bleu de MACÉ ne présente pas de spores. Il est immobile. Les éléments se groupent d'une façon irrégulière, souvent on note la présence de deux germes, l'un au bout de l'autre.

COLORABILITÉ

Le Bacille bleu de MACÉ présenterait une affinité assez variable pour les colorants. C'est ainsi que MACÉ l'aurait pris tour à tour pour un germe prenant ou ne prenant pas le Gram. Néanmoins le plus souvent il ne se colore qu'aux deux extrémités.

TEMPÉRATURE DE CULTURE

Ce germe pousse très bien et d'une façon très rapide à l'étuve à 35° C. En une nuit on peut observer une très belle strie sur gélose, qui se colore en bleu assez rapidement, lorsque la culture est extraite de l'étuve.

Sur la plupart des milieux, que ce soit à la température de l'étuve ou à celle du Laboratoire, ce Bacille bleu pousse très vite et bientôt son développement s'arrête tout d'un coup. C'est alors que sur gélose se forme une grande quantité de cristaux incolores.

CARACTÈRES DE CULTURE

SUR MILIEUX SOLIDES

Gélose. — Cultivé sur gélose ordinaire le Bacille de MACÉ donne des colonies analogues à celles du Colibacille mais présentant une teinte gris bleu au centre. L'aspect de ces colonies est fonction, dans une grande mesure, de la concentration du milieu en gélose. C'est ainsi que dans certaines conditions il est possible d'obtenir des formes visqueuses ayant un reflet bleu sombre au centre.

Sur gélose maltosée, additionnée de sérum on n'observe pas un développement très important après 18 heures. Le pigment apparaît un peu plus tard et diffuse dans le milieu d'une façon très rapide. Ce caractère rapprocherait le Bacille bleu de MACÉ de *B. indigonaceus*.

La gélose maltosée simple est beaucoup moins favorable au développement du Bacille.

La gélose glycinée fournit des cultures bleuâtres au bout de 40 heures.

La gélose glucosée tournesolée ne voit pas son aspect changer et les colonies obtenues sont grises.

La gélose dextrinée constitue un excellent milieu. Il apparaît très rapidement une pigmentation foncée, accompagnée d'un très grand nombre de cristaux incolores. On aperçoit parfois des points bleus très distincts.

La gélose de SABOURAUD ne paraît pas favoriser beaucoup le développement et la chromogénèse du Bacille de MACÉ.

Gélatine. — Sur gélatine ce Bacille se développe assez rapidement donnant un pigment violet, ne pouvant se différencier de celui fourni par *B. violaceus*. La liquéfaction ne s'observe qu'après un long séjour à la température de 20° C. et on peut l'empêcher totalement en utilisant un milieu à très forte concentration en gélatine. Dans ces conditions les colonies présentent l'aspect de petites houpes.

Sérum coagulé. — Le Bacille bleu donne sur ce milieu un développement assez abondant; après une semaine on note l'existence d'une bande humide, blanche, jaune sale qui vire au bleu, par la suite. Le milieu n'est pas liquéfié.

Si on ajoute du maltose au sérum il y a en trois jours apparition d'une très belle strie colorée en bleu. Le maltose dans ces conditions aurait la

propriété d'exalter la fonction chromogène, ce que MACÉ a mis en évidence facilement : une première culture en strie sur ce milieu lui donnait en cinq jours un pigment bleu très net, que des passages successifs amenaient à un ton beaucoup plus foncé, allant jusqu'au noir intense, ceci en 48 heures.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre glycinée on perçoit tout au plus une légère coloration olivâtre du substratum. Ce milieu alcalinisé fortement ne permet pas la culture de ce germe, mais si à cette pomme de terre alcaline on ajoute du liquide d'ARNAUD et CHARRIN on voit apparaître au bout de 24 heures une colonie jaunâtre devenant olivâtre, tandis que le tubercule est coloré en jaune vif.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Le Bacille bleu de MACÉ ensemencé sur bouillon pousse très bien à la température ordinaire. Il donne très rapidement en 48 heures un trouble uniforme.

Lait. — Sur lait tournesolé on constate dès le dixième jour un virage au rouge.

Liquide d'ARNAUD et CHARRIN. — Le liquide d'ARNAUD et CHARRIN, additionné de lactate d'ammoniaque et d'asparagine, constitue le milieu par excellence pour le développement rapide du Bacille bleu. Par agitation des cultures on obtient un beau pigment bleu ciel très pur. Le liquide reste trouble durant des mois et très tard, de petits flocons et des précipités bleus se sédimentent au fond du tube. Le liquide devient jaunâtre, puis par agitation à l'air, verdâtre et enfin bleu. Le Bacille bleu exige donc de très bonnes conditions d'oxygénation du milieu pour que son pigment apparaisse.

INDOL

Le Bacille bleu de MACÉ ne donne pas d'Indol aux dépens de la molécule protéique qui lui est fournie dans les milieux nutritifs sur lesquels il se développe.

B. VISCOFUCATUS

Chromobacterium viscofucatum Harrison et Barlow 1905

Bergey 1923

B. viscofucatus fut isolé au Laboratoire de Bactériologie de l'Agricultural Collège and Expérimental Station de Guelph (Canada), par F. C. HARRISSON et B. BARLOW en 1906 à partir d'eaux de rivière. Ces derniers l'ont décrit sous le nom de *Bacterium viscofucatum*.

MORPHOLOGIE

C'est un Bacille cylindrique, ordinairement incurvé, parfois droit, de $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 8$ de long sur $0\ \mu\ 6$ à $0\ \mu\ 9$ de large. Les deux extrémités de la plastide sont arrondies. Ce germe immobile ne présente pas de fouets.

Les préparations provenant de cultures effectuées sur gélose sucrée montrent que ces éléments possèdent une capsule.

B. viscofucatus se présente sous forme d'éléments isolés ou plus rarement en chaîne de trois à cinq éléments.

FORMES D'INVOLUTION

Sur de vieilles cultures effectuées à 25° C. les formes ramifiées abondent, ainsi que chez les jeunes cultures faites à la température de 27° C. La longueur varie de $4\ \mu$ à $9\ \mu$ et la largeur de $0\ \mu\ 7$ à $0\ \mu\ 9$. On observe aussi des formes en coin, qui ont $0\ \mu\ 9$ de large à l'extrémité la plus épaisse, décroissant jusqu'à $0\ \mu\ 3$.

Quand les formes ramifiées sont devenues très nombreuses, elles se divisent transversalement en éléments très courts et ovales. De telles formes sont courantes dans les cultures sur lait et sur milieu liquide (après dix jours de croissance entre 20° et 25° C.) soit peptoné à 1 %, soit saccharosé à 5 % ou sur milieux synthétiques.

REPRODUCTION

La reproduction s'effectue par division. Les colorations spécifiques ne décèlent pas la présence de spores.

COLORABILITÉ

B. viscofucatus prend le Gram, se colore en bleu par la méthode de ZIEHL et prend bien les couleurs d'aniline.

En colorant par le bleu alcalin de LÆFFLER, des préparations fixées à l'alcool éther on observe des granulations métachromatiques.

TEMPÉRATURE

B. viscofucatus se développe entre 0° et 39° C. (température où il ne pousse plus), mais la température optimum semble être de 20° C. Il est tué après exposition à une température de 65° C. pendant 10 minutes.

AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

La lumière solaire altère les cultures en détruisant une sucrase sécrétée par *B. viscofucatus*.

L'oxygène est nécessaire à la vie de ce germe. Un tube ensemencé et cacheté avec de la cire présente un développement abondant, mais il ne se produit aucun pigment. Si on ouvre le tube, le pigment réapparaît, mais redisparaît en trois jours, si on referme le tube hermétiquement. On observe en même temps un fort dégagement gazeux. Le chlorure de sodium gêne la croissance et la production du pigment.

Dans les milieux contenant 8 % de chlorure de sodium la production du pigment s'amoindrit et à 9 % la croissance est complètement arrêtée.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. La gélatine à 10 % se montre défavorable à la croissance de *B. viscofucatus* même si elle est additionnée d'hydrates de carbone. Il en est de même pour la production de pigment. Le développement est amélioré en réduisant la concentration de gélatine à 6 %.

Gélatine sucrée. — Par addition d'hydrate de carbone, on obtient un milieu électif : gélatine 6 %, extrait Liebig 0,5 %, hydrate de carbone

25 %, chlorure de sodium 0,5 %. Au bout de 24 heures à 20 ° C. les colonies apparaissent sur ce milieu, mais il n'y a pas encore de pigmentation. Au bout de cinq jours les colonies de surface ont environ 1 mm. La liquéfaction commence dans les parties de la plaque où les colonies sont les plus nombreuses. Elles sont gommeuses et s'enlèvent facilement.

On peut alors distinguer deux sortes de colonies : bleues et violettes sur gélatine sucrée (saccharose, dextrose, mannite et maltose), vertes sur gélatine sans hydrates de carbone, ou additionnée de dextrine, de galactose ou d'amidon. La coloration violette des colonies ressemble plus au violet de gentiane qu'à la teinte *violaceus* de la table de SACCARDO.

Sur gélatine maltosée les colonies sont violet foncé, il y a peu de grains de pigment.

Sur gélatine saccharosée les colonies étaient d'un bleu très net dans certaines parties, violettes dans d'autres, tandis que sur gélatine dextrosée et mannitée elles étaient nettement bleues bien que présentant du vert foncé par places ; on notait en même temps de nombreux grains de pigment dans les parties où la gélatine était colorée, c'est-à-dire où il y avait le plus de sucre.

Sur gélatine sans hydrates de carbone il est à remarquer que certaines colonies vertes présentent des cristaux incolores entourant les colonies à une certaine distance ; ces cristaux accusent une forme pyramidale à base carrée et sont placés bout à bout.

Ensemencé sur gélatine en piqûre *B. viscofucatus* ne se développe que faiblement. En ajoutant à ce milieu des hydrates de carbone on a au bout de 24 heures une colonie plate, blanche, parfois pigmentée, qui croît le long du canal d'inoculation. Au bout de huit à dix jours la liquéfaction commence sur gélatine mannitée, plus tard avec d'autres sucres. Au bout de deux mois le tube est complètement noir, toute la gélatine est liquéfiée.

Gélatine alcaline. — Si on alcalinise la gélatine avec de la potasse N/10, le pigment se manifeste, mais à condition que l'alcalinité ne soit pas trop grande. Une acidité notable gêne la production de pigment.

Gélose. — La gélose peptonée semble peu favorable au développement de *B. viscofucatus*. La croissance est lente ; en dix-huit jours on n'observe aucun pigment. Si on ajoute 1 % de saccharose à la gélose neutralisée en présence de phtaléine on observe une croissance rapide et abondante, l'eau de condensation étant très visqueuse, il n'y a pas production de pigment.

En utilisant de la gélose à l'extrait Liebig de composition suivante :

Extrait Liebig 0,5 %, peptone 1 %, chlorure de sodium 0,5 %, gélose 1 %, préalablement acidifiée on observe une croissance rapide à la température de 18°-22° C.

Sur gélose saccharosée les colonies sont mi-bleues, mi-violettes.

Sur gélose dextrinée elles prennent une teinte bleue franche.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre le pigment colore le tubercule en bleu verdâtre, puis en bleu brillant, devenant foncé (à 18°-22° C.) après quatre à sept jours. Au bout de huit jours la coloration commence à atteindre la colonie microbienne, mais elle reste toujours moins colorée que le substratum. A une température de 25°-27° C. le bleu apparaît déjà après 24 heures, mais disparaît beaucoup plus vite. Si on opère à 37° C. il n'y a plus de coloration.

MILIEUX SOLIDES

Lait. — Cultivé sur lait *B. viscofucatus* donne une coloration bleue ou bleue foncée. La peptonisation atteint 2 à 3 mm. de profondeur en six jours. Au bout de quinze jours la transformation est complète.

Les cultures sur lait en flacon (à 25°-27° C.) présentent en huit jours une coloration verte diffuse, dans la moitié supérieure du flacon.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Les milieux permettant le mieux de mettre en évidence le pigment, sont les liquides de COHN. Tel est du moins l'avis des auteurs.

Les liquides de COHN sont gélosés à 1 %. Le développement est rapide. Le pigment atteint son maximum d'intensité en quatre à cinq jours de culture à 20° C. et colore tout le milieu. Cette teinte persiste douze jours, puis prend une teinte vineuse. Cette couleur est très visible par transparence. Le milieu d'abord translucide devient opaque, puis une couleur verte remplace la teinte vineuse, faisant place à une coloration ocre au bout de deux mois.

Certaines cultures évoluent plus rapidement et la couleur bleue est remplacée par une teinte jaune ambrée.

Les différentes teintes ont été évaluées à l'aide de l'échelle de teintes de SACCARDO. On a observé les teintes suivantes: 29 *ochraceus*, 30 *mel-leus*, 31 *ferrugineus*, 33 *flavo-virens*, 36 *prasinus*, 37 *aerugineus*, 40 *atrocyanus*, 41 *cyaneus*, 42 *carulcus*, 44 *plumbeus*, 46 *atro-violaceus*, 47 *violaceus*, 49 *lividus*, 50 *vinosus*.

PIGMENT

Il semble que la production de pigment est sous la dépendance d'hydrates de carbone et d'éléments minéraux, ainsi que sous l'influence de l'acidité. La fonction chromogène est favorisée en milieu acide.

Extraction. — Le pigment est extrait des cultures sur agar par l'alcool à 50°. On obtient une solution bleue par réflexion, vineuse par transparence. Ce pigment précipite par addition d'alcool à 95° et le filtrat garde sa couleur vineuse.

Propriétés du pigment. — Le pigment est soluble dans l'eau, dans l'alcool faible, insoluble dans l'alcool, l'éther, la benzine, le chloroforme.

En traitant le pigment par l'acide chlorhydrique, sulfurique ou azotique, il devient bleu brillant, violet, puis vineux. Avec des solutions acides N/10 la variation est plus lente et moins intense. On observe les mêmes phénomènes avec les acides organiques.

Les solutions alcalines de soude N, de potasse N, de carbonate de soude font passer la couleur bleue primitive au bleu verdâtre, puis la font disparaître.

Les solutions alcalines N/10 ou de concentration plus faible produisent des variations de couleur mais plus lentement. Par addition d'un excès d'acide ou d'alcali on fera apparaître à volonté la coloration vineuse ou bleue. La coloration vineuse peut elle-même être changée en bleu vert par un excès d'alcali.

Le sulfate de magnésium change le bleu en violet intense.

Toutes ces variations se produisent en l'espace de quelques minutes. Selon les réactifs utilisés les morceaux d'agar colorés sur lesquels ils agissent prennent un aspect de pierres précieuses brillantes telles que saphir, améthyste, émeraude.

Le chlorure de sodium a une action différente suivant la proportion dans laquelle il est mélangé au milieu de culture. A 1 % déjà il exerce une action défavorable sur la croissance et la pigmentation. Cette action se confirme avec l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Dans la proportion de 9 % la croissance et la pigmentation sont totalement arrêtées.

B. POLYCHROMOGENES Chamot et Thiry 1900

Bacille polychrome THIRY, *Bacillus polychromogenes* CHAMOT et THIRY (1900).

Le Bacille polychrome a été rencontré plusieurs fois par MACÉ dans des eaux de puits. Il avait la propriété de donner sur des plaques de gélatine des colonies entourées d'une zone d'un beau vert foncé. MACÉ l'avait nommé provisoirement « *Bacille fluorescent vert foncé* ».

B. polychromogenes a été étudié d'une façon magistrale par G. THIRY en 1894.

Ce Bacille serait très peu répandu, il a pu cependant être trouvé plusieurs fois dans une eau de puits à Nancy. Les auteurs qui l'ont étudié n'ont pas mis en évidence de variétés naturelles.

MACÉ s'est posé la question de savoir s'il ne s'agissait pas du *Bacillus lacmus* de SCHRÖTTER. Le peu de description qui en est donné par SCHRÖTTER ne permet pas de vérifier l'hypothèse de MACÉ.

MORPHOLOGIE

La forme du Bacille est excessivement variable et aucune forme constante n'a pu être obtenue dans les différents milieux quels qu'ils soient. C'est ainsi que *B. polychromogenes* est un germe court à extrémités arrondies pouvant présenter des éléments sphériques, parfois même des formes démesurément longues à bouts renflés, rectilignes ou courbes.

Les plastides sont tantôt isolées, tantôt groupées en diplobacilles ou en chaînettes. Il en est de même des formes sphériques qui peuvent présenter des colonies de huit éléments, des tétrades, des grappes.

COLORATION NATURELLE

Généralement incolore le Bacille est parfois coloré : tantôt la plastide est colorée en rouge ou en bleu, ceci uniformément, tantôt l'examen microscopique révèle de petits grains intrabacillaires disposés sans ordre régulier et colorés en bleu foncé.

STRUCTURE

Souvent les Bacilles paraissent homogènes. Parfois on observe des grains de taille et de couleur diverses.

On note souvent la présence d'une capsule chez les formes rondes isolées ou en diplocoques. « *Sur sérum de cheval après solidification il y a parfois des chaînettes de trois à huit éléments avec une capsule nette et colorable* » (G. THIRY).

SPORES — KYSTES

Formes conservatrices. — Certains Bacilles et certaines formes rondes, certaines granulations de taille variable contenues dans les Bacilles présentent parfois un éclat verdâtre en même temps qu'ils sont très brillants. Ces formes sont surtout abondantes dans les dépôts.

MOTILITÉ

Le plus souvent ces Bactéries sont lentement mobiles ou parfois tout à fait immobiles. Il n'a pas été possible de mettre de fouets en évidence.

FORMES RAMIFIÉES

Bien que présentant des formes ramifiées très nettes sur des milieux tels que gélose peptone craie, sérum peptone glycérine, bouillon peptone ordinaire, *B. polychromogenes* ne permet pas d'obtenir des formes ramifiées en culture dans des œufs ou sur des milieux additionnés de caféine ou de sels de lithine.

Les formes ramifiées obtenues sur milieux solides et liquides sont grandes et se terminent généralement en massue.

Conditions d'apparition des différentes formes. — Le déterminisme des formes est complètement inconnu. THIRY n'a pu mettre en évidence les influences de milieux ou les conditions extérieures déterminant la production des diverses formes. Néanmoins les formes grandes seraient plus nombreuses sur des milieux défavorables, tandis que les formes petites, rondes ou elliptiques domineraient quand le milieu paraît convenir au développement.

D'après THIRY « *il paraît bon pour étudier une forme sur un milieu donné de ne pas observer dans des conditions quelconques, mais de préférence après des passages rapides et répétés sur le milieu afin d'entraîner l'espèce, de lui permettre de s'adapter, de ne pas modifier tout à fait le milieu de l'ensemencement et d'obtenir des cultures plus homogènes* ».

COLORABILITÉ

B. polychromogenes se colore facilement avec tous les colorants usuels. Il prend le Gram.

TEMPÉRATURE

Le Bacille se développe bien à la température du Laboratoire surtout si elle ne s'élève pas trop. Il donne les plus belles colorations aux températures voisines de 12°-15°-20° C.

AÉROBIOSE

Ce germe est aérobic. Il peut encore croître légèrement dans une atmosphère privée d'oxygène, mais il ne colore pas le milieu.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX LIQUIDES

Gélatine.

1° *En plaques.* — Les colonies données par le Bacille polychrome présentent une teinte verte. Elles sont entourées par une zone vert foncé ou vert bleu. Elles sont douées d'un énergique pouvoir liquéfiant. Beaucoup de colonies présentent des grains bleu foncé ou bleu noir. Les colonies profondes sont globuleuses ou lenticulaires ; elles présentent souvent des stries d'accroissement concentriques.

Les colonies superficielles offrent des types divers : étoiles, rosaces, etc... toutefois les types discoïdes sont les plus fréquents.

2° *En piqure.* — La colonie se développe d'une façon superficielle lorsqu'onensemence sur de la gélatine peptone alcaline.

Au bout de quelques jours la gélatine au voisinage de la colonie est colorée en vert émeraude. La coloration devient de plus en plus intense par la suite, envahissant la presque totalité de la gélatine.

A partir de ce moment on note un dichroïsme, allant en augmentant avec l'âge de la culture. La gélatine est liquéfiée en un large entonnoir de forme variable. La partie liquéfiée se trouble, passe d'une intense couleur vert pré, au vert sale. A celle-ci succèdent bientôt des teintes rougeâtres, de feuille morte ou de rouille. Parfois les teintes rouge bleu, violet, prédominent et peuvent s'observer seules.

Gélose peptone. — L'aspect des cultures obtenues sur gélose peptone est tout à fait variable. On obtient d'ordinaire une teinte gris bleu, qui peut être pointillée de bleu indigo foncé, tandis que le substratum est coloré en violet intense ou bleu violet.

On obtient quelquefois des cultures vertes.

Sérum solidifié. — *B. polychromogenes* liquéfie rapidement le sérum de cheval coagulé. Les teintes observées sont le plus souvent jaunes, rosées, vertes, bleues, violacées ou grises.

Si on additionne le milieu de glucose ou de saccharose, on obtient un excellent milieu de développement, mais la liquéfaction est retardée.

Avec le blanc d'œuf coagulé les cultures sont généralement bleu verdâtre pâle, vert sale, jaunes. Le pigment diffusé est rose ou bleu violacé.

Pomme de terre. — *B. polychromogenes* sur tubercule de pomme de terre colore le substratum de façons diverses et donne des colonies de colorations variées. Souvent celles-ci sont gris bleu, jaunâtre ou marron, la pomme de terre devenant bleu indigo dans toute sa masse.

Sur pomme de terre trempée dans la soude à 0,50 % on peut selon CHAMOT, obtenir une coloration bleue indigo foncé, parfois presque noire. Par vieillissement la teinte prise par le tubercule passe à une teinte rouille, surtout dans les régions soustraites à l'action de l'air. Des fragments de pomme de terre, ainsi colorés, étalés et séchés en grande surface, bleuisent rapidement à l'air.

Artichaut. — On note un verdissement très rapide du substratumensemencé avec le *B. polychromogenes*.

MILIEUX LIQUIDES

Solution de peptone et bouillon peptoné. — Le Bacille polychrome détermine sur ces milieux un trouble uniforme et il ne colore jamais le liquide. Très rarement on constate la présence d'un léger anneau violet, adhérent au tube, près de la surface du liquide.

Lait. — Ensemencé sur du lait non écrémé à la température ordinaire (20° C.) ce Bacille se développe particulièrement bien, sur la pellicule existant à la surface, au moment de la stérilisation. Il la liquéfie rapidement après avoir coloré en jaune vif la partie exposée à l'air.

La peptonisation totale en une huitaine de jours laisse un liquide rousâtre.

INDOL

B. polychromogenes ne donne pas d'indol dans les milieux peptonés dans lesquels on l'ensemence.

AGENTS CHIMIQUES

Le glucose ajouté à la gélatine peptone augmente, selon sa dose, la production de bleu pur, bleu violet intense, mais il retarde la liquéfaction de façon considérable.

Si le tartrate et le succinate d'ammoniaque favorisent la production du rouge, l'asparagine au contraire détermine une pigmentation vert intense.

Le phosphate de calcium ajouté aux milieux, à la pomme de terre en particulier, est favorable pour l'obtention du bleu ou du bleu violet.

Le phosphate de soude au contraire favorise le développement et la formation de colonies jaune serin ne colorant pas le substratum.

A partir de *B. polychromogenes*, MACÉ et THIRY, malgré l'application soutenue de conditions dysgénésiques, n'ont pu créer une race incolore ni obtenir des races en fixant des variations.

PIGMENT

Nous n'envisageons pas dans ce paragraphe l'étude du pigment sécrété par *B. polychromogenes*. Nous aurons l'occasion d'y revenir longuement dans la partie de cet ouvrage consacrée à l'étude de quelques pigments.

CHAPITRE IV

B. VIOLACEUS Macé 1888

B. violaceus MACÉ 1888 a encore été appelé *Bacteridium violaceum* SCHRÖTTER 1880, *B. violaceus* G. et P. FRANKLAND 1889, *Pseudomonas violacea* (SCHRÖTTER) MIGULA 1900, *Pseudomonas pseudianthina* MIGULA 1900.

B. violaceus est une Bactérie que l'on rencontre fréquemment dans l'eau. Elle a été isolée d'eaux de différentes provenances par MACÉ qui la mentionne en 1888, comme existant dans des eaux de puits, de citerne, de rivière. ARTAULT (1893) l'a signalée dans des œufs et en expliquait la provenance par l'infection de ceux-ci au contact de la paille humide.

Rencontrée fréquemment dans les liquides en putréfaction, sa présence dans les eaux coïnciderait, d'après MACÉ avec celle d'une forte proportion de matières organiques. MACÉ (1888), BRÉVILLE (1897), IMBEAUX (1897).

D'après MACÉ selon toute probabilité *B. violaceus* correspondrait au germe provenant de l'air décrit par SCHRÖTTER (1881) sous le nom de *Micrococcus violaceus*.

BUJWID (1887) l'aurait caractérisé de même dans l'eau provenant de la fusion de grêlons.

MORPHOLOGIE

Une culture de *B. violaceus* est constituée par des bâtonnets de $2\ \mu$ à $3\ \mu$ de long sur $0\ \mu\ 4$ à $0\ \mu\ 5$ de large. Le germe isolé par G.-C. FRANKLAND et P.-F. FRANKLAND à partir d'une eau de rivière et étudié par ces savants en 1889 était un bâtonnet court de $1\ \mu\ 7$ de long sur $0\ \mu\ 8$ de large.

MOTILITÉ

B. violaceus serait un germe immobile, d'après MACÉ, pouvant être lentement mobile dans les liquides. D'après le même auteur il ne présenterait pas de fouets à la température ordinaire. Cependant MIGULA a pu colorer

un fouet polaire chez *Ps. violacea* MIGULA et *B. violaceus* G. et P. FRANKLAND.

SPORULATION

Dans les vieilles cultures *B. violaceus* formerait des spores arrondies légèrement elliptiques.

La gélose constituerait le milieu le plus favorable à la sporulation. Les spores ne sont jamais bien nombreuses et apparaissent au milieu de la plastide, qui se gonfle.

COLORABILITÉ

B. violaceus ne prend pas le Gram. Il se colore facilement sous l'action du bleu de méthylène ou de toluidine. Il n'est pas acido et alcoolo-résistant.

TEMPÉRATURE

B. violaceus cultive à la température du Laboratoire. Il serait assez sensible à la chaleur, car un séjour d'une minute à 35° C. suffirait à détruire 80 % environ des plastides.

AÉROBIOSE

B. violaceus est un germe aérobie.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — 1° Sur plaques de gélatine on obtient rapidement des colonies à bords sinueux, présentant une surface ondulée. La partie centrale de la colonie s'enfonce assez rapidement et la liquéfaction s'opère brusquement. La colonie nage alors sur le liquide obtenu, se colorant en violet après un temps assez long. Cette coloration se fait tantôt sur toute sa surface tantôt sur une partie en procédant par zones concentriques.

2° Sur gélatine en piqure on observe peu de temps après l'ensemencement une liquéfaction. Une pellicule adhérente aux parois se forme en surface et présente parfois un mince liseré violet. La liquéfaction est fon-

tion de la concentration en gélatine du milieu. Les cultures dégagent fréquemment une forte odeur d'acide butyrique.

Gélose. — Sur gélose on obtient en deux à trois jours une culture épaisse et plissée qui devient rapidement d'un beau violet noir.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — En bouillon le développement de *B. violaceus* se fait comme dans la gélatine liquéfiée, c'est-à-dire : formation d'un liquide trouble surmonté d'une pellicule blanche, adhérente aux parois.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

W.-J. HARTLEY (1913) a cultivé, sur milieu synthétique un Bacille qui paraît identique à *B. violaceus*.

INDOL

B. violaceus ne forme pas d'indol.

NITRATES

On n'observe pas de réduction de nitrates.

VARIABILITÉ DU POUVOIR CHROMOGÈNE

En outre *B. violaceus* possède la propriété de sécréter un pigment violet, caractéristique de l'espèce et sur lequel nous aurons l'occasion de revenir dans la partie de ce travail consacrée à l'étude des pigments.

D'après certains savants, la coloration fournie par *B. violaceus* ne semblerait pas imprégner les cellules. Maximum à un certain moment, elle arrive après plusieurs passages sur les milieux de culture à disparaître complètement. Les cultures deviennent moins abondantes et sont colorées seulement dans certaines fractions de leur étendue. Par des passages appropriés sur pomme de terre on arrive à faire récupérer à ces germes, en partie au moins, leur pouvoir chromogène.

*
* *

Les Bactériologistes américains décrivent sous le nom de *Chromobacterium violaceum* (BERGONZONI) une Bactérie dont nous allons donner rapidement les caractères.

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM (BERGONZONI)

Comittee S. A. B. 1920

On peut, d'après BERGEY, rencontrer encore ce germe sous le nom de *Bacillus violaceus*, société d. Naturalisti, Ser. 2, 14, 1881, 149.

MORPHOLOGIE

Chromobacterium violaceum se présente sous forme de bâtonnets grêles de $0\ \mu\ 8$ à $1\ \mu$ sur $2\ \mu$ à $5\ \mu$ isolés ou en chaînettes.

Il est mobile et possède des fouets péritriches.

COLORABILITÉ

Il ne prend pas le Gram.

TEMPÉRATURE

Habitant l'eau il possède un optimum de température vers $25-30^{\circ}$ C.

AÉROBIOSE

Il est aérobic.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Les colonies sur gélatine sont rondes, grises, possédant une bordure entière et présentent une coloration violette dans la région centrale.

Ensemencée en piqure sur tube de gélatine cette Bactérie donne une liquéfaction en entonnoir, en même temps qu'il se forme un sédiment violet dans le liquide.

Gélose. — Sur gélose les colonies sont blanchâtres, plates, brillantes, humides, devenant violettes.

Sur gélose inclinée la culture est violet foncé et s'étend en surface.

Bouillon. — Sur bouillon on constate un léger trouble avec formation d'un anneau violet et d'un sédiment visqueux.

Lait tournesolé. — Sur ce milieu on constate l'apparition d'une pelli-cule violette en même temps qu'une peptonisation et une alcalinisation.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre *Chromobacterium violaceum* produit une culture violet foncé.

Sérum de cheval. — Sur sérum de cheval de Lœffler on constate une liquéfaction lente.

INDOL

Chromobacterium violaceum ne forme pas d'indol et ne réduit pas les nitrates.

B. VIOLACEUS LAURENTIUS Jordan 1890

B. violaceus Laurentius, encore appelé *Pseudomonas Laurentia* (JORDAN) MIGULA 1900, a été trouvé dans les eaux du bassin de filtration de la Laurence. Il a été décrit par LUSTIG et par VOGES en 1893.

MORPHOLOGIE

C'est un bâtonnet de $3\ \mu$ à $3\ \mu\ 6$ de long et de $0\ \mu\ 6$ de large. Il possède des extrémités arrondies. D'aspect très svelte, il se groupe le plus souvent par deux, d'autres fois en chaînettes de quatre à cinq éléments. Les plastides se déplacent avec un mouvement très vif. On n'a pas pu mettre en évidence la présence de spores.

COLORABILITÉ

B. violaceus Laurentius ne prend pas le Gram. Il se colore bien par le bleu de méthylène, le bleu de toluïdine, la fuchsine.

CARACTÈRES DE CULTURE

Comme tous les germes de ce groupe il se différencie surtout par ses caractères cultureux.

Gélatine. — C'est sur la gélatine que *B. violaceus Laurentius* donne les colonies les plus caractéristiques et où sa fonction chromogène est la plus active. Au bout de 48 heures à la température ordinaire, *B. violaceus Laurentius* donne des colonies de deux espèces : les unes superficielles sont croûteuses, fines, légèrement violettes, entourées d'une zone de liquéfaction, les autres profondes sont rondes, granuleuses et présentent un milieu foncé et des bords rayonnants.

Bouillon. — Le développement est faible. Quand on additionne le bouillon de nitrate de potasse le développement est plus riche et il se produit une coloration violette.

Lait. — *B. violaceus Laurentius* coagule le lait et le colore en violet.

B. VIOLARIUS ACETONICUS Bréaudat 1906

B. violarius aceticus fut étudié par BRÉAUDAT (1906) qui lui a donné son nom. Ce Bacille provenait de l'eau d'alimentation de Saïgon.

MORPHOLOGIE

B. violarius aceticus est un Bacille court épais de 1 μ de large sur 3 μ de long. Il est animé d'un mouvement d'oscillation rapide.

BRÉAUDAT n'a pu mettre de fouets en évidence chez *B. violarius aceticus* et d'après lui les spores apparaissent vers le sixième jour de culture.

COLORABILITÉ

Sur des préparations colorées, faites à partir de culture sur bouillon âgée de 24 heures, BRÉAUDAT a observé que ce germe présentait des granulations polaires colorées très fortement, tandis que la partie centrale était incolore. Le sixième jour de culture, les plastides sont plus difficilement colorables. Ordinairement elles se teignent facilement par les couleurs d'aniline, ne prennent pas le Gram, et se colorent en bleu par la méthode de ZIEHL.

TEMPÉRATURE

B. violarius aceticus se développe de 30° à 37° C., soit en aérobie, soit en anaérobie, mais à ce moment la production de pigment est arrêtée.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Sur gélatine on obtient des colonies incolores, si on utilise de la gélatine privée de peptone. Ces colonies sont au contraire très colorées si la gélatine contient 2 à 3 % de peptone.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre la coloration violette est si intense que les colonies paraissent presque noires.

MILIEUX LIQUIDES

Tous les milieux liquides conviennent à la culture de *B. violarius acetonicus*, mais exigent la présence de peptone pour permettre la formation de pigment.

Lait. — Le lait,ensemencé avec ce germe, est coagulé par une présure fonctionnant en milieu acide. La coagulation se liquéfie totalement peu à peu. On trouve alors dans le milieu de la caséase.

ACTION SUR LES NITRATES

B. violarius acetonicus réduit les nitrates en nitrites sans dégagement gazeux.

PRODUCTION D'ACETONE

SHARDINGEN (1904) avait déjà signalé un Bacille produisant de l'acétone. *B. macerans*, découvert dans les eaux de rouissage, produit en effet de l'acétone et de l'alcool à partir de divers hydrates de carbone.

B. violarius acetonicus fournit de l'acétone. Cette production est arrêtée par la formation d'ammoniaque. Le rendement en acétone est dans ces conditions assez faible (environ 0,2 à 0,4 pour 1.000). Pour améliorer le rendement on peut ajouter au milieu du carbonate de chaux. De cette manière le liquide reste neutre et la production d'acétone peut alors atteindre 1 gr. 3 par litre.

BRÉAUDAT produit avec ce germe de l'acétone en quantité notable en utilisant le milieu suivant :

Peptone Chapoteau	10 gr.
Saccharose	35 gr.
Carbonate de Potasse	45 gr.
Eau distillée	1000 cm ³

BACTERIUM CRISTALLINO VIOLACEUM SP. NOV. CHOLKEVITCH

Cette espèce a été décrite il y a peu de temps par CHOLKEVITCH (1922) qui l'avait isolée d'un morceau de tourbe provenant des environs de Leningrad.

MORPHOLOGIE

Bacterium cristallino violaceum est un germe mobile dans les cultures jeunes. Il présente des extrémités arrondies. Ses dimensions selon le milieu varient de $3 \mu 25$ à $2 \mu 25$ de longueur. En milieu liquide la longueur n'est que de $1 \mu 5$ et la largeur comprise en $0 \mu 75$ et $0 \mu 37$.

En cultures jeunes de 48 heures sur gélose glycinée, les bâtonnets se présentent isolés ou groupés par deux. Dans les vieilles cultures, on trouve des chaînettes longues et filamenteuses, parfois renflées, contenant une grande quantité de grains métachromatiques. Quelquefois dans les cultures âgées, on remarque des cellules renflées en forme d'épingle, de fuseau ou de boule qui sont bourrées de grains métachromatiques que l'auteur appelle « *dégénérescence métachromatique* ».

Coloration et structure. — Dans les cultures jeunes les bâtonnets ont une membrane fine et incolore qui s'épaissit dans les cultures âgées, en se colorant souvent en jaune rouge, plus rarement en violet. A chaque extrémité du bâtonnet se trouve un gros grain polaire de volutine.

Capsule. — Le bâtonnet est entouré d'une grosse capsule visible sans coloration, mais très perceptible lorsqu'il est traité par la technique à l'encre de Chine.

COLORABILITÉ

Bacterium cristallino violaceum ne prend pas le Gram.

SPORULATION

Cette Bactérie ne donne pas de spores.

PIGMENT

Dans les cultures de 24 heures, l'auteur décrit un processus de destruction des Bacilles, qui s'agglutinent en une masse informe où ne dominent

bientôt plus que des grains polaires constituant des amas. Cette masse homogène de grains cristallise bientôt en aiguilles violettes, plus rarement jaunes ou rouges. Sur ces cristaux on voit toujours des débris du corps granulé multicolore dont ils proviennent.

Les cristaux forment des agrégats en forme d'éventail, de papillon, parfois ils sont isolés ou constituent de longs filaments jaunes, rouges ou violets.

Dans les cultures jeunes, sur la gélose glycinée en particulier, il se forme des plaques violettes qui disparaissent, tandis que le milieu nutritif se colore en violet sale. Les colonies présentent à leur pourtour des étoiles étroitement accolées, se composant d'aiguilles cristallines jaunes et violettes, montrant encore des restes de corps microbiens.

Le pigment serait un produit d'excrétion, il serait fixé par le corps des Bactéries mortes et constituerait des corps granulés amorphes, analogues aux sphérites décrits par BEIJERINCK chez *B. cyaneo-fuscus*.

Propriétés du pigment. — Les cristaux violets formés dans les cultures sont insolubles dans l'eau, à froid ou à l'ébullition, dans l'éther sulfurique, le xylol, la benzine, le chloroforme, la glycérine et les alcools.

L'auteur n'a pu séparer de leur squelette albuminoïde la matière colorante des cristaux sphériques.

Sous l'action des solutions alcalines faibles on obtient un liquide bleuâtre, qui devient violet et le demeure sous l'action de solutions faibles des acides chlorhydrique et azotique.

Examen spectroscopique. — L'examen spectroscopique des lames enduites de pigment non purifié a donné deux bandes d'absorption (essais effectués par le Professeur LUBIMENKO). La première, très nette, s'étend de $\lambda = 585$ à $\lambda = 625$. La deuxième, plus faible, s'étend de $\lambda = 510$ à $\lambda = 480$.

B. JANTHINUS (ZOPF) Flugge 1886

B. janthinus ZOPF a été encore appelé *Bacterium ianthinum* ZOPF 1885, *Bacillus janthinus* ZIMMERMANN 1890; *Pseudomonas ianthina* (ZOPF) MIGULA 1900; *Chromobacterium janthinum* BERGEY 1923.

B. janthinus ZOPF a été décrit par FLUGGE en 1886, par BUJWID en 1888 et par LUSTIG en 1893. Il avait été isolé d'une eau de conduite. De nombreux auteurs tels que HUEPPE, ZIMMERMANN (1890) l'ont trouvé de même dans l'eau.

MORPHOLOGIE

B. janthinus se présente sous la forme d'un germe en bâtonnet de $1\ \mu\ 5$ à $3\ \mu\ 5$ de longueur, sur $0\ \mu\ 6$ de largeur. Les extrémités de celui-ci sont arrondies. Mis en émulsion dans l'eau physiologique ou en culture sur milieu liquide, ce germe est animé d'un mouvement de rotation sur lui-même, grâce à de longs fouets polaires.

Il ne possède pas de spores.

COLORABILITÉ

B. janthinus ne se colore pas par la méthode de GRAM.

TEMPÉRATURE

La température optimum de culture de *B. janthinus* se trouve aux environs de 15°C .

AÉROBIOSE

La présence d'oxygène n'est pas nécessaire à son développement.

CARACTÈRES DE CULTURE

Les aspects cultureux sont les meilleurs caractères de différenciation de *B. janthinus*.

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Ensemencé sur gélatine *B. janthinus* donne des colonies bleutées, irisées ou violet sombre.

La gélatine n'est liquéfiée que très lentement et seulement par les colonies de surface. Les colonies profondes ne la liquéfient pas et ne produisent pas de pigment.

Gélose. — Le gélose ne permet d'obtenir des cultures colorées qu'après plusieurs semaines. A ce moment, les colonies sont d'un beau violet foncé.

Pomme de terre. — La pomme de terre constitue de même un milieu très favorable à la culture de *B. janthinus*.

MILIEUX LIQUIDES

Les milieux de culture liquides ne sont pas favorables à la végétation de *B. janthinus*. Les plastides se multiplient lentement en donnant un trouble uniforme. Seule la surface se colore en bleu très pâle. Après cinq à six semaines de séjour à la température du laboratoire, on obtient une culture se composant d'un dépôt que surmonte un liquide louche dont la surface seule est violette.

PIGMENT

Le pigment produit par *B. janthinus* n'a pas pu être isolé.

* * *

Le germe isolé quelques années auparavant par FLAGGE et PROSKAUER et que nous allons étudier maintenant, serait à rapprocher de *B. janthinus*.

B. LIVIDUS Plagge et Proskauer 1887

Bacillus lividus est encore appelé *Bacterium lividum* (PLAGGE et PROSKAUER) MIGULA 1900: *Chromobacterium lividum* (FLUGGE) BERGEY 1923.

Ce germe a été décrit en 1887 par PLAGGE et PROSKAUER qui l'avaient isolé d'une eau de conduite de Berlin.

MORPHOLOGIE

C'est une Bactérie chromogène produisant un pigment noir bleu intense sur gélatine et mesurant de 1 μ 5 à 4 μ 7. Elle se présente sous la forme d'un bâtonnet à bouts arrondis.

MOTILITÉ

En appliquant diverses méthodes de coloration et de culture les auteurs n'ont mis en évidence ni spores ni fouets. Il est donc à présumer que la motilité assez faible d'ailleurs n'est pas due à des cils. Cependant d'après BERGEY (1923) *B. lividus* est mobile et possède des fouets; de plus, d'après MIGULA, il donne des spores.

COLORABILITÉ

Le Bacille de PLAGGE et PROSKAUER se décolore assez rapidement par la méthode de Gram.

TEMPÉRATURE

Ce Bacille se développe rapidement à la température ordinaire soit en présence d'oxygène, soit en son absence.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Un des milieux les plus favorables à la culture du Bacille de PLAGGE et PROSKAUER est la gélatine. Sur ce substratum, il donne d'abord à la température du laboratoire des colonies gris clair, s'étendant pour former des plaques. A la surface de celles-ci, on voit apparaître au bout d'un certain temps des grains de matière colorante.

Sur gélatine se développent deux sortes de colonies: les unes super-

ficielles donnant un pigment noir bleu ne diffusant pas dans la gélatine, les autres profondes incolores.

PLAGGE et PROSKAUER (1887) et VOGES (1893) ont montré que ce bacille produisait, au bout d'un temps plus ou moins long, une faible liquéfaction à la surface de la gélatine et un léger enfoncement des colonies.

Gélose. — Sur gélose, la multiplication des plastides et la production de pigment sont ralenties.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre, on note la présence d'une culture luisante, visqueuse, se colorant rapidement en bleu noir.

Lait. — Sur lait, ce germe se développe abondamment en produisant un non moins abondant pigment.

Il semble donc à l'examen de ces caractères que la fonction chromogène soit sous la dépendance de la présence de l'oxygène de l'air.

B. MEMBRANACEUS AMETHYSTINUS Eisenberg 1891

B. membranaceus amethystinus est encore connu sous le nom de *Bacterium amethystinum* (EISENBERG) MIGULA 1900; et de *Chromobacterium membranaceum* BERGEY 1923.

B. membranaceus amethystinus fut découvert en 1891 dans l'eau d'un puits de Spolato et décrit par EISENBERG. Une variété « *mobilis* » a été décrite en 1892 par GERMANO.

MORPHOLOGIE

C'est un bâtonnet aux bouts arrondis d'une longueur de $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 4$ et de $0\ \mu\ 5$ à $0\ \mu\ 8$ de large. EISENBERG n'a observé aucune forme d'invololution.

Reproduction. — La reproduction se fait par division. *B. membranaceus amethystinus* ne paraît pas avoir de spores.

MOTILITÉ

Ce germe est complètement immobile.

MODE D'ASSOCIATION

B. membranaceus amethystinus est souvent groupé en amas irréguliers. On observe parfois des germes isolés, qui se colorent mieux que les germes groupés.

COLORABILITÉ

Ce Bacille ne se colore pas par la méthode de Gram. Il n'est pas acido-alcoolo-résistant, mais prend bien les couleurs d'aniline. On constate sur les germes isolés des condensations bipolaires.

TEMPÉRATURE

Ce germe ne croît que vers 15° à 20° C. A 37° C. la croissance est nulle.

AÉROBIOSE

C'est un anaérobie facultatif mais la production de pigment semble être sous la dépendance de l'oxygène de l'air.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélose. — Cultivé sur gélose, *B. membranaceus amethystinus* donne au bout de 24 heures des colonies blanches, laiteuses, qui commencent à se colorer dès le huitième jour et deviennent violet foncé, présentant un éclat métallique en un mois. Les colonies bien isolées se détachent facilement du substratum nutritif.

Gélatine. — Sur gélatine, la culture apparaît en trois ou quatre jours. Les colonies de 1 à 22 mm. de diamètre sont violet foncé et entourées par une auréole formée par la gélatine liquéfiée. La liquéfaction gagne tout le substratum en quinze à vingt jours et les colonies nagent dans le liquide de protéolyse.

Si onensemence des boîtes de Petri avec un émulsion très diluée, la colonie prend une teinte jaunâtre donnant l'impression d'une souillure à la surface de la gélatine. Puis on note un début de liquéfaction, en même temps qu'apparaît une teinte violette à la surface des colonies. Au bout d'un mois celles-ci se sont étendues jusqu'à se rejoindre et former un voile bleu violet uniforme.

Pomme de terre. — La culture sur pomme de terre est très lente et l'enduit obtenu présente une teinte jaune sale devenant vert olive.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Le bouillon ne paraît pas favoriser d'une façon très grande le développement de *B. membranaceus amethystinus*. Les tubes ensemencés avec ce germe présentent une pellicule violette en surface, en même temps que se sédimente un dépôt violet. Le bouillon prend par la suite une teinte brune assez foncée.

PIGMENT

Le pouvoir chromogène de *B. membranaceus amethystinus* est très variable. La gélatine paraît un excellent milieu pour obtenir des cultures présentant un violet intense.

Propriétés du pigment. — Le pigment est soluble dans l'alcool, inso-

luble dans le chloroforme, l'éther, l'eau. Par addition d'alcali il vire au vert, tandis qu'il redevient bleu violet sous l'action d'un acide.

Pouvoir pathogène. — Ce germe semble être pathogène pour le cobaye et amener une baisse de température de 10° C environ.

*
* *

Auprès de *Bacillus membranaceus amethystinus* EISENBERG il est absolument nécessaire de signaler des espèces mobiles connues sous le nom de *Bacillus membranaceus amethystinus I* et *Bacillus membranaceus amethystinus II* qui ont été décrites en 1913 par BAMPTON et reprises par BERGEY 1923.

Nous allons étudier rapidement chacune de ces deux souches.

Il nous semble que l'orthographe du mot *Améthystinus* n'est pas exacte. Néanmoins ayant été écrit de cette façon dans les publications consultées, nous avons tenu à le reproduire littéralement.

N'est-ce pas là le fait d'une simple faute d'impression ?...

(Note de l'Auteur.)

B. MEMBRANACEUS AMETHYSTIMUS I 1913 ⁽¹⁾

Ce germe est encore connu sous le nom de *Chromobacterium membranaceum* (BAMPTON) BERGEY 1923.

MORPHOLOGIE

Ce germe est un Bacille de $1\ \mu\ 4$ à $3\ \mu\ 5$ se présentant soit isolé, soit en courtes chaînettes.

Il est mobile, possède des fouets péritriches et ne prend par le Gram. Habitant l'eau, son optimum de température se trouve à $37^{\circ},5\ C$.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Ensemencé sur gélatine en plaques, il donne des colonies blanc bleuâtre, légèrement convexes, ondulées, légèrement granulaires.

Sur tubes de gélatine il pousse en masse blanche, se répandant sur toute la surface donnant une culture violette.

Il liquéfie la gélatine lentement.

Gélose. — *B. membranaceus amethystimus I*, ensemencé sur gélose, donne des colonies petites, convexes, blanc jaunâtre, humides, de teinte violet pâle.

Sur gélose inclinée, il donne une culture blanche membraneuse, devenant jaune pâle avec un centre violet.

Bouillon. — Ensemencé sur bouillon, ce germe donne un trouble avec une pellicule colorée en bleu pâle et un sédiment blanchâtre.

Lait tournesolé. — Ensemencé sur lait tournesolé, il l'alcalinise puis le peptonise.

Pomme de terre. — On observe une culture variant du brun au violet pâle, membraneuse, à aspect granulaire.

Sérum. — On observe une peptonisation lente.

B. membranaceus amethystimus I ne forme pas d'indol, ne réduit pas les nitrates, attaque le dextrose et le maltose.

(1) Voir note de l'Auteur page 101.

B. MEMBRANACEUS AMETHYSTIMUS II Bampton 1913 ⁽¹⁾

Ce germe est encore connu sous le nom de *Chromobacterium Bamptonii* Comb. nov. BERGEY.

MORPHOLOGIE

Ce germe est constitué par des Bacilles de $1\ \mu\ 4$ à $3\ \mu\ 5$ de long avec les extrémités arrondies.

Il est mobile, possède des fouets péritriches, ne prend pas le Gram. On le rencontre dans l'eau. Son optimum de température est de 30° C.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — Ensemencé sur gélatine, *B. membranaceus amethystimus II* donne des colonies pâles, bleuâtres, s'enfonçant dans le milieu et devenant violettes en profondeur.

Sur tubes de gélatine, on observe une masse culturale pâle violette, liquéfiant, avec production de flocons bleus dans le liquide.

Gélose. — Les colonies sur gélose sont violet pâle.

Sur gélose inclinée, *B. membranaceus amethystimus II* donne une couche blanc grisâtre, devenant violette.

Bouillon. — Ensemencé sur bouillon, il donne un trouble avec une pellicule violette.

Lait tournesolé. — Le lait tournesolé est alcalinisé et peptonisé sous l'action de ce germe.

Pomme de terre. — Ensemencé sur ce tubercule, il produit une masse colorée en brun jaunâtre à aspect membraneux et granulaire.

Sérum coagulé. — Sur sérum, il y a formation d'une membrane violet-blanc, il n'y a pas de peptonisation.

B. membranaceus amethystimus II ne produit pas d'indol, il ne réduit pas les nitrates et attaque le dextrose, le maltose et le sucrose.

(1) Voir note de l'Auteur page 101.

BACILLE VIOLET PATHOGÈNE DE GAUDUCHEAU 1907

Ce germe a été isolé d'un puits à Hanoï et étudié en 1907 par GAUDUCHEAU. Il se rapprocherait, d'après l'auteur de *B. janthinus* et de *B. violaceus Laurentius*.

MORPHOLOGIE

C'est un Bacille de 1 μ à 3 μ de long, présentant souvent une forme incurvée.

Il est mobile, ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Se développant très bien sur gélose, pomme de terre, bouillon au-dessus de 20° C., il pousse plus difficilement sur la gélatine qu'il liquéfie.

Il coagule le lait, puis redissout le coagulum.

Le Bacille violet décrit par GAUDUCHEAU donne un pigment violet intense, presque noir sur gélose et pomme de terre.

Ensemencé en bouillon, il donne une teinte violette en surface, tandis que le reste du liquide est trouble et présente une coloration bleue.

Les cultures fourniraient encore, entre autres particularités, la propriété de dégager une odeur rappelant un peu celle d'amandes amères. Les cultures sont tuées si elles sont soumises à la température de 56°-57° C. pendant quinze minutes.

GAUDUCHEAU aurait constaté chez ce germe l'existence d'une très grande variabilité de la fonction chromogène. C'est ainsi que ses premières cultures effectuées en bouillon lui auraient donné un voile très épais violet foncé, dont il aurait vu diminuer d'une façon considérable l'épaisseur et l'intensité de la teinte, au cours des passages successifs sur ce milieu. Ceci est un fait banal qui s'observe avec tous les germes du groupe des *violaceus*.

PIGMENT

Le pigment sécrété par le Bacille violet pathogène est insoluble dans l'eau, l'éther et le chloroforme. Il est soluble dans l'alcool et vire au vert sous l'action de la soude.

POUVOIR PATHOGÈNE

Le Bacille violet pathogène de GAUDUCHEAU présenterait un pouvoir hypothermisant considérable pour le cobaye, dont la température serait abaissée de plus de 10° C., peu de temps après l'inoculation.

CHAPITRE V

Parmi les germes chromogènes produisant des pigments bleus solubles, il est deux espèces sur lesquelles nous allons maintenant nous arrêter.

Nous les classerons dans un chapitre à part, du fait de leur faculté de sécréter en dehors du pigment bleu, un pigment fluorescent et deux pigments rouge et noir.

Dans ce chapitre, nous envisagerons donc tout d'abord le Bacille pyocyanique et le Bacille du lait bleu puis quelques germes se rapprochant de ceux-ci.

B. PYOCYANEUS Gessard 1882

La Bactérie du pus bleu n'est guère connue que sous le nom de *Bacillus pyocyaneus* GESSARD 1882.

Elle a néanmoins été décrite par SCHRÖTTER (1872), sous le nom de *Bacterium aeruginosum* et en 1886 sous le nom de *Bacillus aeruginosus*.

MIGULA (1900) l'a rangée dans son genre *Pseudomonas* et la désigne sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le Bacille pyocyanique peut exister dans les eaux, dans l'air, dans le sol. On le rencontre à l'état pathologique dans le pus bleu et les lésions qu'il provoque.

Grâce aux travaux de GESSARD (1882) qui l'a découvert, RADAIS (1897), MAMELLE (1919), on connaît aujourd'hui trois types dans l'espèce *B. pyocyaneus*. Ce sont les variétés pyocyanogène, mélanogène et érythrogène. La variété mélanogène, qui a été décrite par RADAIS (1897), se détache nettement des deux autres. La variété érythrogène a été isolée à peu près en même temps par GESSARD (1917) et MAMELLE sous la direction de M. le Professeur LASSEUR en 1919.

Les variétés mélanogène et érythrogène se distinguent facilement les unes des autres. En effet, en dehors du pigment fluorescent et du pigment bleu vert que sécrètent toutes les variétés, les souches érythrogènes possèdent la propriété de sécréter sur eau peptonée un pigment rouge et les souches mélanogènes un pigment noir.

Les recherches effectuées depuis de très nombreuses années ont amené GESSARD à donner un tableau systématique permettant la classification des germes pyocyaniques.

C'est ainsi que se basant sur la chromogénèse des cultures en bouillon, le savant avait admis pour chaque type l'existence de races A.F.S. selon la nature des pigments obtenus.

MARCHAL (1932) a eu l'occasion de montrer qu'en utilisant des milieux de composition chimiquement définie les dénominations de GESSARD n'étaient pas toujours justifiées. Malgré cela nous reproduisons ci-contre le tableau d'identification des germes pyocyaniques proposé par GESSARD n'y attachant qu'une valeur toute relative et purement documentaire.

Tableau d'identification des germes pyocyaniques d'après GESSARD
(Extrait des *Annales de l'Institut Pasteur*.)

I. BOUILLON		II. EAU PEPTONÉE		III. GELOSE		MILIEUX ou l'espèce se décide	O GERMES non PYOCYAN.
COLORATION	CONCLUSION	COLORATION	CONCLUSION	PEPTONE GLYCÉRINÉE COLORATION	GERMES identifiés		
Bleu de pyocyanine + vert fluorescent	Bac. pyocyanique de race A	bleu de pyocyanine rouge brun rouge nulle	Var. pyocyanogène Pe — melanogène M — erythrogène E — achromogène O	» » » »	» » » »	I — — —	
Bleu de pyocyanine	Bac. pyocyanique de race P	bleu de pyocyanine rouge brun rouge nulle	— — — — Pe M E O	» » » » »	» » » » »	— — — — —	
vert fluorescent.	race F (1)	bleu de pyocyanine rouge brun id. + bleu rouge id. + bleu nulle	Bac. pyoc. de Var. Pe Var. M (2) Bac. pyoc. de Var. M Var. E (2) Bac. pyoc. de Var. E Var. O (2)	» bleu de pyoc. (3) » bleu de pyocyan. » bleu de pyocyan. nulle	» M F » E F » O F	II III II III II III	bacille à pigment vert fluorescent
nulle	race S (1)	bleu de pyocyanine rouge brun id. + bleu rouge id + bleu nulle.	Bac. pyoc. de Var. P ₂ Var. M (2) Bac. pyoc. de Var. M Var. E (2) Bac. pyoc. de Var. E Var. O (2)	» bleu de pyocyan. » bleu de pyocyan. » bleu de pyocyan. nulle	» M S » E S » O S	II III II III II III	B. sans pigment

(1) Pour les germes avérés Pyocyaniques par ailleurs (en 2 ou 3).

(2) Pour les germes avérés Pyocyaniques (en 3).

MORPHOLOGIE

B. pyocyaneus, quelles que soient ses variétés, est un Bacille dont la longueur varie suivant la nature du milieu dans lequel il croît.

MARCHAL (1932) a étudié le rapport $\frac{l}{r}$ de LASSEUR sur une série de souches de ce germe. Les résultats qu'il a obtenus lui ont permis de montrer que ce rapport variait dans les limites suivantes :

minimum : entre 2,40 et 3,83 ;

moyenne : entre 4,73 et 6,65 ;

maximum : entre 7 et 9,60 ;

Le Bacille pyocyaneus est susceptible de présenter des modifications morphologiques nombreuses provoquées par l'addition aux milieux de culture, de substances variées.

On sait en effet que l'on peut obtenir des formes en cocci en additionnant au milieu 1 p. 1000 de créosote, des formes en spirilles avec l'acide borique à 7 p. 1000, des filaments très longs (GUIGNARD et CHARRIN) avec le bichromate de potasse. Les modifications morphologiques obtenues ne sont cependant pas héréditaires et un réensemencement, à partir de ces cultures, dans des milieux normaux, ramène toujours l'apparition de la forme initiale.

MOTILITÉ

Le Bacille pyocyaneus est un germe mobile.

Cette motilité est due à la présence d'un seul fouet polaire, quelle que soit la variété considérée. Toutefois les fouets seraient beaucoup plus longs dans le type mélanogène que dans les types pyocyanogène et érythrogène.

Ph. LASSEUR, P. VERNIER, A. DUPAIX et S. ZAHL (1930) ont montré que chez *B. pyocyaneus pyocyanogenes* la longueur des fouets varie de 5 μ à 7 μ . Chez *B. pyocyaneus melanogenes* les organes du mouvement atteignent jusqu'à 12 μ . Dans ce cas ils constituent les organes de mouvement les plus longs que LASSEUR ait observés chez les germes fluorescents.

Le fouet unique de *B. pyocyaneus* se présente sous un aspect spiralé très régulier. Il se colore facilement.

Le Bacille pyocyaneus ne présente pas de spores.

Les solutions diluées de rouge neutre, de bleu de toluidine, de bleu de méthylène, permettent de mettre en évidence une membrane se colorant d'une façon sélective et à l'intérieur de celle-ci, une vacuole remplie de granulations. Les extrémités polaires montrent des condensations très visibles.

Le Bacille pyocyanique ne prend pas le Gram. Mettant à profit l'importance des notions établies par LASSEUR dans la technique de la coloration de Gram, MARCHAL a déterminé la « *vitesse de décoloration* » au sens de LASSEUR. Il a observé qu'au bout de 10 secondes d'action de l'alcool à 95°, les plastides des différentes souches examinées étaient complètement décolorées.

AÉROBIOSE

Le Bacille pyocyanique est un anaérobie facultatif. Il se développe cependant beaucoup mieux en présence de l'oxygène de l'air.

TEMPÉRATURE

Cultivant à toutes les températures comprises entre 15° et 43° C., *B. pyocyaneus* croît néanmoins plus facilement à la température de 37° C.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Les germes pyocyaniques sont doués d'un pouvoir protéolytique intense vis-à-vis de la gélatine. La variété mélanogène plus aérobie que les autres, ensemencée en piqure, liquéfie la gélatine d'une façon beaucoup moins rapide. Comme il résulte des travaux de LASSEUR, DUPAIX et MARCHAL (1931), le pouvoir protéolytique des germes pyocyaniques est fonction du pH des systèmes utilisés.

Gélose. — Sur gélose inclinée les germes pyocyaniques donnent une culture abondante grisâtre, glaireuse. Le milieu présente une fluorescence verte très nette.

Pomme de terre. — Les différentes souches de germes pyocyaniques,

ensemencées en strie sur des tubercules de pomme de terre, donnent une culture épaisse le long de la strie d'ensemencement.

Si les pommes de terre ont été auparavant glycélinées, on constate l'apparition d'une pigmentation vert bleu intense. Quelquefois, on observe le curieux phénomène du caméléonage : la culture brunâtre devient verte sous l'action d'un simple grattage à l'aide d'un fil de platine.

Albumines animales. — Les germes pyocyaniques exercent un intense pouvoir protéolytique vis-à-vis de l'albumine d'œuf coagulé ou du sérum de cheval coagulé.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Ensemencé sur bouillon, ce germe donne un trouble uniforme en 24 heures. Les jours suivants se développe un voile blanchâtre ou légèrement rosé, d'aspect épais, chagriné. On note en même temps l'apparition d'une fluorescence verdâtre à la surface du milieu nutritif. La pigmentation verte, constatée dès les premières 24 heures de culture, gagne toute la masse, fonçant beaucoup par agitation. Dans la suite, la teinte passe au vert foncé, la fluorescence disparaissant. En culture âgée, le liquide est coloré en brun.

Les cultures sur bouillon, de même que celles faites sur eau peptonée, dégagent une odeur aromatique assez caractéristique de coumarine. Toutes les souches de Bacille pyocyanique ne dégagent pas cette odeur : certaines en effet produisent une odeur assez forte et désagréable.

Les cultures d'un certain âge ont une réaction très alcaline et après un certain temps elles sont filantes, visqueuses.

L'influence de la concentration en ions H^+ a une très grande importance sur la faculté que possède le germe pyocyanique, de donner un pigment fluorescent.

Lait. — L'ensemencement de *B. pyocyaneus* sur des tubes de lait, permet de noter l'apparition d'une coagulation plus ou moins rapide. Celle-ci est suivie d'une peptonisation, qui est fonction de l'activité de la variété utilisée. La coagulation obtenue serait due à la sécrétion d'une présure par le Bacille, les germes pyocyaniques ne fermentant pas le lactose. Le milieu peptisé prend une teinte verdâtre qui fonce énormément par agitation du tube.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Détruit par un chauffage de 5 minutes à 59° C. *B. pyocyaneus* résiste bien et pendant longtemps dans les cultures abandonnées et dans le milieu extérieur. Toutefois, les antiseptiques entraînent rapidement sa mort.

ACTION SUR LES NITRATES

B. pyocyaneus réduit les nitrates en nitrites puis en azote. En bouillon additionné de nitrate de potasse il y a un dégagement d'azote plus rapide et plus abondant.

POUVOIR FERMENTATIF DES GLUCIDES

Les alcools polyatomiques tels que la glycérine, la mannite, l'isodulcite, les sucres en C⁵ ne sont pas attaqués par les germes pyocyaniques (MARCHAL 1932).

Les diverses variétés de ce germe décomposent le xylose.

Les hexoses tels que le glucose et le galactose sont attaqués par toutes les variétés, sauf par *B. pyocyaneus melanogenes*.

Le levulose n'est pas décomposé, il en est de même des hexobioses (saccharose, maltose, lactose) et d'autres hydrates de carbone tels que l'inuline et la dextrine.

ANTAGONISME

B. pyocyaneus exercerait une action antagoniste vis-à-vis de certains germes.

RÉACTION A L'ÉGARD DES SÉRUMS

C'est en étudiant le Bacille pyocyanique que CHARRIN et ROGER (1889) ont découvert le phénomène de l'agglutination. Les germes pyocyaniques ne permettent pas d'obtenir des sérums très actifs, lorsqu'ils sont inoculés à des animaux de laboratoire.

En 1919 LAUNOY, en injectant à un animal une culture de Bacille pyocyanique, a obtenu un sérum empêchant du pouvoir protéolytique à l'égard de tous les germes pyocyaniques, à quelque race ou variété qu'ils appartiennent. Le sérum antiprotéasique de LAUNOY peut être utilisé dans les cas douteux pour la diagnose de l'espèce.

VARIATIONS DE LA STABILITÉ DES SUSPENSIONS

Nous avons eu l'occasion au début de ce travail de montrer que si certains ions sont absolument nécessaires pour assurer le métabolisme bactérien, il en est d'autres qui ont une grande importance dans le phénomène de précipitation. Il a été mis en évidence par MALVOZ, étudié successivement par MICHÆLIS (1911), POPPE (1913), EISENBERG (1919), repris dans la suite par LASSEUR (1921-24) et à maintes reprises, depuis, par ses collaborateurs.

En ce qui concerne le Bacille pyocyannique, MARCHAL a vérifié que dans l'espèce pyocyannique, toutes les variétés n'étaient pas précipitables par les ions H^+ et que les souches qui ne précipitaient pas sous l'action de ces ions à charge simple, voyaient la stabilité de leurs suspensions disparaître, sous l'action des ions à charge triple tels que Fe^{+++} et Al^{+++} .

POUVOIR PATHOGÈNE

B. pyocyaneus est un agent des plaies qui est devenu rare à l'heure actuelle. On le rencontre cependant dans diverses manifestations pathologiques.

VIRULENCE

CHARRIN (1887-88-89) a particulièrement bien étudié la virulence et les effets du Bacille pyocyannique chez le lapin. Il est souvent virulent d'emblée et cette virulence peut être exaltée par des passages successifs sur l'animal.

TOXINES

Les cultures de *B. pyocyaneus*, soumises à la stérilisation par chauffage ou par filtration, sont toxiques pour le lapin, chez lequel elles déterminent des paralysies. On a isolé une pyocyanolysine et une pyocyanase des cultures de Bacille pyocyannique.

ROCHAIX, TAPERNOUX et COUTURE (1933) ont isolé de blancs d'œufs, qui avaient été éliminés par mirage, des germes pyocyaniques typiques.

CHROMOGENÈSE

En ce qui concerne la chromogénèse du Bacille pyocyannique nous aurons l'occasion de l'envisager en étudiant la pyocyanine.

B. JASMINO-CYANEUS KLINGER 1903

B. jasmino-cyaneus a été isolé par KLINGER en 1903 à partir d'échantillons de bileensemencés sur plaques préparées avec du bouillon caféiné, suivant la technique de FICKER. Ce savant l'a encore retrouvé dans des eaux de ruisseau. *B. jasmino-cyaneus* serait une Bactérie voisine de *B. pyocyaneus*, dont elle ne se différencierait que par l'odeur intense de jasmin qu'elle dégage et qui lui a valu son nom.

MORPHOLOGIE

Ce germe est constitué par un bâtonnet extrêmement mobile. Il se développe en anaérobie à des températures variant entre 24° et 37° C. Il donne en 24 heures sur les milieux nutritifs de très belles colonies.

Il ne forme pas de spores et n'acidifie pas les milieux au cours de son développement. *B. jasmino-cyaneus* ne prend pas le Gram et se colore bien par les colorants d'aniline.

CARACTÈRES DE CULTURE

Ce germe a été particulièrement bien étudié par GACHTGENS (1905) qui en a fait une espèce présentant les caractères culturels suivants :

Gélatine. — Ensemencé sur plaques de gélatine ce Bacille forme des colonies irisées, présentant des bords lobés. Au cours du développement le milieu est rapidement liquéfié et se colore en bleu.

Gélose. — Sur ce milieu, on observe des colonies de même aspect, mais l'agar se colore en vert émeraude.

Bouillon. — Sur ce milieu, on observe une coloration verte uniforme, en même temps que la formation d'un voile membraneux à la surface du liquide.

Lait. — *B. jasmino-cyaneus* coagule et peptonise le lait.

Milieux sucrés. — Dans les milieux contenant du lactose et du glucose ensemencés avec ce Bacille on n'observe pas de dégagement gazeux.

Pomme de terre. — Sur ce substratum ce germe donne une couche abondante brunâtre, tandis que le tubercule se colore en vert intense.

INDOL

B. jasmino-cyaneus ne donnerait pas d'indol.

En résumé toutes les cultures de ce germe sont caractérisées par une coloration bleu-vert intense du milieu ayant servi à son développement et par l'odeur de jasmin qu'il produit.

POUVOIR PATHOGÈNE

B. jasmino-cyaneus serait pathogène pour la souris et le cobaye, qui, après inoculation, sont atteints de péritonite aiguë et de septicémie; ils meurent rapidement.

B. SYNCYANEUS EHRENBERG 1840

Bacillus syncyaneus EHRENBERG G. (1840). *Vibrio cyanogenus* FUCHS (1841). *Bacillus syncyaneus* SCHRÖTTER (1880). *Bacillus cyanogenus* FLUGGE (1886). *Pseudomonas syncyanea* MIGULA (1900).

Bacillus syncyaneus décrit par EHRENBERG détermine la coloration bleue observée dans le lait, ce qui l'a fait dénommer : Bacille du lait bleu.

Depuis EHRENBERG de très nombreux auteurs ont étudié le Bacille du lait bleu. C'est ainsi que l'on peut citer les travaux de FUCHS (1841), de NEELSEN (1880), de REISET (1883), de HUEPE (1884), de BRACONNOT (1889), de HEIM (1890), de GESSARD (1891), de SIMON (1908), de WOLF (1913).

Tous ces auteurs ont donné des détails précis sur la morphologie et la biologie de *B. syncyaneus*.

MORPHOLOGIE

C'est un Bacille dont les dimensions varient de 2 μ à 4 μ pour une largeur de 0 μ 5. Il est mobile et possède des fouets polaires.

A l'état libre dans le lait il présente des extrémités arrondies.

Il peut s'observer sous forme de petites zoogléas muqueuses.

SPORULATION

B. syncyaneus est un germe sporogène. Ses spores, un peu ovoïdes, un peu plus grosses que les bâtonnets dans lesquels elles déterminent des renflements, prennent naissance à la température ordinaire. La spore est d'habitude polaire et donne au bâtonnet l'aspect d'une massue. Parfois elle est médiane, ce qui donne un Bacille en fuseau.

FORMES D'INVOLUTION

B. syncyaneus donne facilement des formes d'involution. Elles ont été décrites par NEELSEN en 1880, qui cultivait ce Bacille dans la solution de COHN, additionnée de nitrate de potasse et par HUEPPE, qui ensemait *B. syncyaneus* sur des solutions de tartrate d'ammoniaque.

COLORABILITÉ

Le Bacille du lait bleu prend le Gram et se colore facilement sous l'action des couleurs d'aniline. Les techniques de coloration spéciales ont permis de mettre en évidence chez cet organisme deux à trois fouets à un pôle (MACÉ 1901), un seul fouet à une extrémité présentant deux à quatre spirales de $3\ \mu$ à $9\ \mu$ (LASSEUR 1930).

AÉROBIOSE

Le Bacille d'EHRENBERG est un germe exclusivement aérobic. L'oxygène lui est absolument indispensable pour vivre et se développer. « *La production de sa matière colorante exige un renouvellement constant de l'air* » (DIDIER SIMON 1908).

TEMPÉRATURE

Cette Bactérie se développe très bien à la température ordinaire, tandis que le séjour à l'étuve à 30° C. entrave déjà son développement et qu'une élévation à 40° C. détermine souvent sa mort. Elle produit son maximum de pigment vers 18° - 20° C.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Ensemencé sur plaques de gélatine *B. syncyaneus* donne de petites colonies blanchâtres, arrondies, granuleuses, s'étalant à la surface en gouttelettes muqueuses, tandis que le substratum se colore en gris bleu.

Une gelée, acidifiée légèrement par addition d'une solution d'acide lactique à 0,2 %, paraît plus favorable au développement du germe qu'une gélatine à réaction légèrement alcaline.

WOLF (1913) a décrit des races liquéfiant la gélatine, mais seulement au bout de plusieurs semaines.

B. syncyaneus ensemencé sur gélatine en piqure forme une culture mince le long de la gouttière d'inoculation. En surface on note un petit disque blanc; la gélatine se colore en bleu verdâtre passant au brun par vieillissement.

En gélatine bouillon *B. syncyaneus* donne une fluorescence verte (SCHOLL 1889, HEIM 1890).

Gélose. — Sur gélose on obtient une couche grise et la partie supérieure du milieu se teinte en brun.

Pomme de terre. — Le tubercule ensemencé avec *B. syncyaneus* se colore, en gris bleu dans la profondeur de ses tissus. La culture se présente sous la forme d'une bande ou d'une série de taches jaunâtres.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — *B. syncyaneus* ensemencé sur bouillon donne un trouble intense dans tout le tube. Il se forme un dépôt épais blanc sale au fond du tube, le liquide se colore en une teinte verdâtre.

Le Bacille du lait bleu a été aussi très étudié par GESSARD en 1891. Il a constaté que sur bouillon, le germe était susceptible de donner, après 48 heures, une fluorescence verte plus sombre que celle obtenue avec le Bacille pyocyanique ensemencé dans les mêmes conditions

Lait. — Ensemencé sur lait, cette Bactérie ne forme pas d'acide et ne détermine pas de coagulation. Les cultures âgées présentent une réaction alcaline faible. On note une coloration bleuâtre, apparaissant en taches à la surface et s'étendant sur toute la couche superficielle.

Si le lait a été stérilisé, le liquide est seulement un peu grisâtre dans sa partie supérieure et la teinte bleue ne se communique pas à lui.

Si le lait n'a pas été stérilisé, toute sa masse se colore en beau bleu ciel. Ceci serait dû à l'acidité produite dans le lait par le développement des Bactéries banales telles que le Bacille lactique.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

B. syncyaneus se développe très bien sur le milieu synthétique de FRÆNKEL et VOGES, à base de lactate d'ammoniaque et d'asparagine, mais la production du pigment y est impossible. L'addition de 3 % de glucose au liquide de FRÆNKEL et VOGES, permet l'obtention d'une teinte bleue, mais on observe de meilleurs résultats sur le milieu préconisé par DIDIER SIMON (1908).

Eau. 1.000 grs.

Succinate de Mg. 5 grs.

Sulfate d'ammonium. 4 grs.

Glucose. 30 grs.

Bi-phosphate de chaux q. s. pour ame-

ner le liquide à une réaction convenable.

Dans ce milieu on observe une production intense de pigment avec une coloration bleu ardoise qui devient ensuite bleu foncé. En général les cultures deviennent vertes avec un précipité noirâtre de matière colorante.

Les milieux basiques sont en général défavorables à la production du pigment.

VITALITÉ

Peu résistant à la chaleur *B. syncyaneus* est tué en quelques minutes à la température de 60° C. Il supporte longtemps la dessiccation.

B. syncyaneus doit se conserver dans le milieu extérieur. En dehors du lait, il peut se développer dans le beurre et le fromage. Il en existerait de nombreuses variétés tel le *Bacille cyaneo-fluorescens* de ZANGEMEISTER.

PRODUITS FORMÉS DANS LES CULTURES

Dans les cultures il ne se forme pas de gaz, mais par contre beaucoup d'ammoniaque et un peu d'indol. Dans le milieu de DIDIER SIMON, le sucre est attaqué avec production d'acide et la Bactérie consomme une partie de l'ammoniaque.

POUVOIR PATHOGÈNE

Cette espèce semble inoffensive pour l'homme et les animaux qu'elle soit administrée par ingestion ou par injection intraveineuse.

PIGMENT

Il a été impossible d'extraire et d'isoler la matière colorante produite par *B. syncyaneus*. Néanmoins on a pu obtenir quelques renseignements concernant ce pigment.

Sous l'action des acides et des bases on observe un virage vague et progressif. Les sels obtenus sont colorés en bleu tandis que la base est colorée en rouge.

L'ammoniaque fait virer au rouge violacé une culture bleue de ce germe, tandis que la soude et la potasse fournissent une teinte rouge brique. Après neutralisation, il est possible de revenir à la teinte bleue sous l'ac-

tion d'un acide fort, mais la teinte obtenue n'est pas aussi nette et aussi intense que dans la culture primitive. Si l'action de la base a été trop prolongée (une quinzaine d'heures par exemple, selon SIMON, 1908) l'addition d'acide détermine une teinte jaunâtre sale très vague. Des quantités très faibles d'acide permettent d'aviver la coloration bleue des cultures.

DIDIER SIMON a décelé la présence d'oxydases dans les cultures de *B. syncyanus*. Il y a un parallélisme entre les propriétés oxydasiques de la culture et la production du pigment.

« *Le phénomène de pigmentation est la conséquence directe de la production d'une oxydase* » (DIDIER SIMON 1908).

Plus la température de culture est basse, plus le pigment se conserve longtemps. Très sensible à la chaleur il vire au vert sous son action.

Légèrement soluble dans l'eau acidulée le pigment est insoluble dans l'eau, l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone, le tétrachlorure de carbone, la benzine, l'alcool amylique. etc...

Sous l'action des oxydants, auxquels elles sont extrêmement sensibles, les cultures bleues donnent, en se décolorant plus ou moins rapidement un précipité noir. En solution acide, les réducteurs font virer la teinte bleue au gris clair puis la décolorent complètement. En solution basique, les réducteurs détruisent rapidement et complètement le pigment.

La matière colorante précipite à l'ébullition : elle forme un précipité avec le sulfate de cuivre, l'acétate de plomb, le bichlorure de mercure et le ferrocyanure de potassium.

L'acide azotique fait virer le pigment bleu au jaune, dans les cultures préalablement chauffées.

La lumière solaire a une influence non négligeable sur la matière colorante produite par *B. syncyanus*. L'apparition du pigment a lieu dans les cultures faites au jour d'une façon plus précoce que dans celles faites à l'obscurité.

Les bouillons colorés en bleu net intense et exposés aux rayons solaires sont décolorés environ deux fois plus rapidement que ceux laissés à l'écluse obscure.

Considérant *B. cyanogenus* comme produisant simultanément l'ammoniaque et l'acide lactique, NEELSEN envisageait le pigment comme la combinaison de ces deux substances provenant de la caséine.

Pour SCHOLL le colorant dériverait de la caséine, les autres composants du lait ne faisant que rendre possible la réaction, sans y prendre part.

Bien qu'on doit admettre sous une certaine réserve les valeurs de HENOCQUE, calculées d'après les figures de NEELSEN (1880), *B. cyanogenus* offrirait une large bande d'absorption s'étendant de $\lambda = 550$ à $\lambda = 605$, comme le fait remarquer A. DUPAIX.

La potasse, agissant sur la culture de ce germe, en ferait passer la teinte au rouge ou au rouge brique, amenant la bande à se déplacer entre $\lambda = 580$ à $\lambda = 470$ comme limites.

B. CYANEO-FLUORESCENS Zangemeister 1895

B. cyaneo-fluorescens, encore appelé *Pseudomonas cyaneo-fluorescens* (ZANGEMEISTER), MIGULA (1900), a été décrit en 1895 par ZANGEMEISTER qui l'avait isolé à partir de lait devenu bleu, dont il pensait obtenir une culture de *B. syncyaneus*. Le lait utilisé avait été placé dans une cave où il était devenu acide et présentait à sa surface des taches rondes, bleu foncé, de la « grosseur d'une pièce de dix francs ».

Le lait coagulé n'était bleu que sous une faible épaisseur, sous les taches.

MORPHOLOGIE

B. cyaneo-fluorescens est un germe de forme ovale, court et épais (2 μ sur 1 μ) qui est un peu plus long que *B. syncyaneus*.

Il présente deux à trois fouets polaires (Ph. LASSEUR, VERNIER, DUPAIX, 1930).

Les Bacilles ne sont jamais associés en chaînettes.

Ils sont très mobiles. Ils croissent à la température de la chambre, mais se développent plus rapidement à une température voisine de 20° C.

Les cultures fraîches sont nacrées, transparentes, produisent des interférences sous l'action de la lumière; elles peuvent se conserver pendant plusieurs mois.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. — *B. cyaneo-fluorescens* ne liquéfie pas la gélatine.

Sur plaques de gélatine, ce Bacille donne des colonies rondes blanchâtres, dont les bords sont nets et irréguliers. La gélatine prend une teinte jaune verdâtre, diffuse, devenant plus jaune et fluorescente.

La souche étudiée par Ph. LASSEUR offrait sur gélatine les caractères suivants: colonies rondes, parfois légèrement plissées au centre, le plus souvent transparentes, mais pouvant aussi offrir une coloration bleuâtre. La colonie non liquéfiante est entourée d'une zone de diffusion gris bleu. Lorsque la gélatine est en couche peu épaisse, les colonies paraissent toujours bleues par transparence.

Les cultures sur gélatine dégagent une forte odeur de triméthylamine.

La teinte jaune de la gélatine se maintient très longtemps, prend par la suite un ton plus jaune, tandis que la fluorescence verte subsiste.

Dans la région de la gélatine qui est en contact direct avec la culture on note l'existence d'une teinte violet brun par transparence, bleuâtre en lumière réfléchie. Ceci est encore plus visible dans les cultures sur gélatine en piqûre à la surface desquelles on note une tache irrégulière, s'étendant en grappe de raisin gris sale, brillante, qui atteint les bords du tube de culture en cinq à sept jours. La culture en piqûre pousse très lentement.

Gélatine sucrée. — *B. cyaneo-fluorescens* donne une couche blanche sur gélatine sucrée en même temps que celle-ci présente une teinte brun violet.

Gélose. — Ensemencé en strie sur gélose, le Bacille colore le substratum en vert brun, tandis que la culture devient grise.

Gélose glycinée. — Sur ce milieu, on note une coloration vert blanc sale, tandis que l'agar se colore en brun sombre avec une pointe de vert

Pomme de terre. — *B. cyaneo-fluorescens* croît assez bien sur pomme de terre.

Lait. — Ensemencé sur lait stérilisé, *B. cyaneo-fluorescens* ne donne aucun changement, même après addition ultérieure d'acide.

Du lait stérile ensemencé simultanément avec *B. acidi-lactis* et *B. cyaneo-fluorescens* devient bleu si la formation d'acide n'est pas trop rapide, c'est-à-dire lorsque le tout est placé dans un endroit frais ou lorsque *B. acidi-lactis* n'est ensemencé qu'un jour après *B. cyaneo-fluorescens*.

Le lait non stérile devient bleu, lorsque conservé dans un endroit frais et humide il est ensemencé avec *B. cyaneo-fluorescens*. Si on le laisse dans un endroit chaud, la formation d'acide détermine une coagulation si rapide, qu'aucune coloration nette ne se produit. Une très faible teinte apparaît seulement.

Lorsqu'on ajoute de l'acide au lait, la caséine se précipite, restant incolore. Le petit lait surnageant se teinte en bleu surtout à la surface et devient vert près des parois du récipient.

Si on ajoute un alcali au lait (solution très étendue de carbonate de soude), on obtient une coloration très lente, mais beaucoup plus intense. Au moment où le bleuissement paraît, le lait est déjà acide.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

MILIEU I DE LASSEUR

B. cyaneo-fluorescens détermine l'apparition d'une fluorescence verte, après 48 heures de culture. La coloration devient jaune brun au bout de quatre jours (LASSEUR inédit).

MILIEU II DE LASSEUR

Après 48 heures, *B. cyaneo-fluorescens* produit un voile incolore, tandis que le liquide est uniformément teinté en bleu ardoise. Par passage sur milieu L2, la teinte de la culture évolue de plus en plus vers le bleu foncé. Tel est l'aspect des cultures en ballon.

En tube on observe généralement deux couches, l'une superficielle gris bleu, l'autre immédiatement inférieure est bleu vert par transparence. Avec l'âge dans les deux cas, le voile devient noir à reflets métalliques (LASSEUR inédit).

PIGMENT

Le pigment bleu est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther et le chloroforme. Il se dissout dans l'acide sulfurique, en donnant une couleur pourpre. La solution obtenue se colore en rose clair par addition de soude et un apport ultérieur d'acide ne régénère pas la matière colorante.

B. LE MONNIERI Lasseur 1912 (1)

B. Le Monnieri a été isolé d'une eau de puits par Ph. LASSEUR. Ce germe, qui est un Bacille fluorescent, offre encore la particularité d'être coloré naturellement en bleu par une matière colorante qu'il sécrète. La substance imprégnant les plastides se retrouve encore précipitée dans les cultures sous forme d'une poudre amorphe ou cristalline. La Bactérie donne encore naissance à des corps colorés solubles, rouges, jaunes ou violets.

MORPHOLOGIE

B. Le Monnieri, décrit par Ph. LASSEUR en 1912, a été étudié ensuite par LASSEUR et VERNIER (1924). Ces auteurs en ont déterminé les dimensions sur des cultures faites en milieu synthétique II de LASSEUR (2). Les plastides présentent l'aspect de bâtonnets droits ou très légèrement incurvés, les extrémités en sont arrondies, rarement effilées. Les dimensions les plus fréquemment observées sont de l'ordre de 2 μ pour la longueur et de 0 μ 5 pour la largeur. L'addition d'acide borique au milieu nutritif détermine un allongement des plastides, tandis que l'acide phénique produit l'effet contraire. La première substance diminuerait donc l'énergie de division, la deuxième l'augmenterait. Le plus souvent les plastides sont isolées ou réunies en diplobacille. On observe parfois de courtes chaînettes de trois ou quatre éléments.

B. Le Monnieri ne produit ni entosporos, ni arthrospores et un chauffage de 10 minutes à 52° C. détruit toutes les plasides d'une culture.

(1) Voir planche en couleur à la fin du volume.

(2) Le milieu synthétique II de LASSEUR est constitué comme suit :

Asparagine	9 grs.
Glycérine	20 grs.
Succinate d'ammoniaque	1 gr.
Glucose	10 grs.
Phosphate dipotassique	2 grs. 500
Sulfate de Magnésie	5 grs.
Chlorure de calcium	0 gr. 400
Sulfate ferreux	0 gr. 100
Solution de soude normale	8 cm ³
Eau distillée: quantité suffisante pour 1.000 cm ³ .	

STRUCTURE

Les auteurs n'ont jamais observé de noyau vésiculeux. « *Les particules chromatiques, en nombre variable, sont disséminées sans ordre. B. Le Monnieri présente un cytoplasme alvéolaire, sans qu'on puisse distinguer de système réticulé* » (LASSEUR et VERNIER 1924).

Les plastides étant naturellement colorées, l'aspect vacuolaire observé sur le frais n'est pas dû à un artifice de préparation.

Sur gélose les plastides plus courtes sont plus riches en grains métachromatiques que les éléments provenant de cultures sur milieu synthétique.

COLORATION

B. Le Monnieri ne prend pas le Gram. La durée de décoloration avec les conditions d'expérience varie dans le rapport de 1 à 5,4.

MOTILITÉ

B. Le Monnieri présente une motilité variable suivant le milieu de culture utilisé. Elle peut être exaltée par l'addition de caféine, de bichromate de potasse, d'acide borique, en quantité ne s'opposant pas au développement bactérien.

Ce germe présente un mouvement de rotation et un mouvement de translation. Le premier se complique souvent du mouvement d'entonnoir décrit par REICHERT et BUTSCHLI. « *Le mouvement de translation est souvent un mouvement saccadé, qui est le propre des monotriches* » (LASSEUR et VERNIER). Le mouvement est dû à des fouets que LASSEUR a mis en évidence à l'aide de la fixation et de l'imprégnation argentique, dont il a décrit la technique en 1915. A l'aide de ce procédé, il a montré que 70 % des plastides sont monotriches et que 30 % possèdent deux fouets.

VITALITÉ

Les cultures âgées de deux mois, effectuées sur pomme de terre et conservées à la température du Laboratoire, redonnent immédiatement des cultures normales, après ensemencement sur milieu LI de LASSEUR.

TEMPÉRATURE

L'optimum de température pour la végétation est voisin de 25° C. et la température maximum pour la production de la matière colorante est aux environs de 20°-22° C. A 30° C. la végétation est ralentie, la chromogénèse très réduite ou suspendue. A 33°-34° C. les cultures restent incolores. A 37° C. on note un arrêt de la végétation et à 41° C. les cultures sont tuées après un séjour de cinq jours à l'étuve.

« Un chauffage à 50° C., durant 10 minutes, suffit à détruire tous les germes, qu'ils proviennent de cultures jeunes, ou appartiennent à des cultures âgées » (Ph. LASSEUR et VERNIER, 1924).

INFLUENCE DE L'OXYGÈNE

« En l'absence d'oxygène, *B. Le Monnieri* ne se développe pas, mais il peut se contenter d'une pression réduite, la végétation est alors moins active et de plus courte durée qu'à l'air libre » (Ph. LASSEUR et P. VERNIER, 1924).

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Les colonies superficielles sont arrondies, elles ont de 1 à 8 millimètres de diamètre, et présentent un centre bleu. Du centre vers la périphérie, on rencontre successivement : une partie centrale bleue, une zone granuleuse jaune ou verdâtre bordant immédiatement le centre, puis une zone liquéfiée incolore et une zone de gélatine colorée en vert ou en jaune verdâtre par la diffusion du pigment dans les parties voisines de la colonie. Dans les colonies de 3 à 4 millimètres on compte aisément 8 à 10 zones concentriques. La colonie est admirablement imbriquée au début (comme le montre la planche coloriée qui se trouve à la fin du volume), mais elle ne présente plus cet aspect d'une façon aussi nette au bout d'un certain temps et à mesure que progresse la liquéfaction. Après plusieurs passages sur gélatine, *B. Le Monnieri* donne deux catégories de colonies, les unes vertes bombées et sphériques, les autres bleues, aplaties. De plus les colonies vertes sont constituées par des Bacilles de plus grande taille que ceux provenant des colonies bleues. On pourrait être tenté de croire à la formation de deux races du même germe, mais il n'en est rien, car

une colonie verte ou bleue redonne rigoureusement le même type tant par la forme de la plastide que par ses propriétés biologiques. Malgré les très nombreux travaux effectués ces dernières années et concernant la dissociation bactérienne au sens de HADLEY (1927), chez de très nombreuses bactéries on est obligé de conclure que, la forme des colonies est fonction de quantité de facteurs ayant leur siège dans le milieu nutritif lui-même.

En présence de glucose, la liquéfaction de la gélatine peptone est beaucoup moins rapide qu'en son absence. Sans glucose, on n'observe de même aucune production de matière colorante. On sait d'autre part, sans qu'il soit nécessaire d'insister longuement, que la liquéfaction de la gélatine est elle-même sous la dépendance de très nombreux facteurs.

Gélose asparagine de LASSEUR. — Après 48 heures de culture, on observe des stries luisantes bleu de Prusse.

Pomme de terre. — *B. Le Monnier* donne, dès le troisième ou le quatrième jour sur pomme de terre glycinée, une coloration bleu de Prusse à aspect souvent métallique. Dans ses portions les moins aérées le tubercule est rouge vineux ou violacé (coloration de la teinte 566 du Code des couleurs). D'autres points sont colorés en jaune ou en vert. La coloration est toute superficielle et ne gagne jamais la profondeur. Sur pomme de terre glycinée préalablement immergée dans une solution de soude à 0,25 % le tubercule n'est jamais coloré en bleu indigo, comme THIRY l'a observé pour *B. polychromogenes*.

Artichaut. — Sur artichaut le Bacille sécrète son pigment bleu en même temps qu'il verdit son substratum nutritif.

Sérum et albumine d'œuf coagulé. — Sur sérum de cheval ou de bœuf on ne note ni coloration, ni liquéfaction, même après trente jours. Il en est de même sur albumine d'œuf coagulé, préparée suivant la technique de GRIMBERT.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Sur bouillon ordinaire, ou glucosé, ou en solution de peptone, *B. Le Monnier* donne un trouble dans les 24 heures. Une mince pellicule apparaît à la surface. Il n'y a pas production de matière colorante.

Lait. — Après 48 heures, la partie supérieure du lait est recouverte d'un voile vert au niveau des parois ; tandis que la coloration est nettement bleue. Vers le quatrième jour apparaît, au-dessous de la couche crèmeuse,

une zone jaune roux qui va en augmentant. Après dix-sept jours, *B. Le Monnieri* a transformé presque tout le lait, mais ils n'a pas été possible de saisir une coagulation préalable de celui-ci.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

MILIEU II DE LASSEUR

Les cultures les plus caractéristiques de *B. Le Monnieri* ont été obtenues par LASSEUR sur le milieu synthétique II de LASSEUR, dont nous avons donné précédemment la composition.

Culture en tube. — Au bout de 48 à 72 heures à 20°-25° C. les cultures présentent à la surface libre du liquide un beau voile bleu, au-dessous duquel se trouve une zone colorée en rouge violet, séparée elle-même de la partie sous-jacente par une faible zone jaune vert. La partie inférieure est constituée par une colonne liquide dont la blancheur contraste avec les couches supérieures (LASSEUR et VERNIER, 1924).

La coloration du voile varie avec l'âge de la culture; au début, voisine de la teinte 42 (*cæruleus*) du Chromotaxia de SACCARDO, elle se rapproche peu à peu de la teinte 41 (*atrocyaneus*) qui correspondrait à peu près au n° 428 du Code des couleurs.

Le pigment jaune n'est qu'un produit d'oxydation du pigment rouge vineux.

Culture en ballon. — Après 48 heures, on observe un voile bleu épais, chagriné, à reflets métalliques, remontant légèrement le long de la paroi. Le reste du liquide est coloré en vert, allant du vert clair au vert olive.

MILIEU I DE LASSEUR

Sur milieu I de LASSEUR, les cultures de *B. Le Monnieri* offrent une fluorescence verte beaucoup plus importante que sur milieu II.

ACTION DU FER

« Le fait le plus saillant dans l'alimentation minérale est le rôle du fer dans la production du corps coloré.

En présence du fer, le voile est bleu, épais, chagriné; en l'absence de ce métal, le voile est très mince, réduit souvent à une faible pellicule; voile ou pellicule sont incolores » (LASSEUR et VERNIER, 1924).

INDOL

Ce germe ne donne pas d'indol dans les milieux de culture quelle que soit leur composition.

ACTION SUR LES NITRATES

B. Le Monnieri agissant sur le nitrate de potasse contenu dans les milieux peut dépasser sa transformation en nitrite. Il peut aller jusqu'à la décomposition complète du nitrate avec dégagement d'azote. « *B. Le Monnieri* est donc un dénitrifiant direct au même titre que *B. pyocyaneus*, mais son action diffère de celle de ce dernier, par la production simultanée d'azote et de gaz carbonique, alors que l'action de *B. pyocyaneus* se borne à un dégagement d'azote sans trace de gaz carbonique » (LASSEUR et VERNIER, 1924).

L'addition de dextrose favorise la dénitrification par *B. pyocyaneus* et *B. fluorescens liquefaciens*. Or, l'addition de ce glucide à la peptone nitrée n'a pas modifié sensiblement la marche de la réduction effectuée par *B. Le Monnieri*.

AGGLUTINATION

En préparant des Lapins avec des plastides de *B. Le Monnieri*, LASSEUR a obtenu des sérums dont le taux d'agglutination le plus fréquemment observé était de 1/2000.

Les sérums préparés avec ce germe agglutinent également *B. cyaneo-fluorescens* au 1/50 et *B. syncyaneus* au 1/100. Les différentes variétés de *B. pyocyaneus*, *B. violaceus*, *B. chlororaphis* ne sont pas agglutinées même au 1/30.

L'épreuve de CASTELLANI, effectuée selon la technique de Ph. LASSEUR, a montré que le sérum préparé avec *B. Le Monnieri* ne renferme pas d'agglutinine spécifique pour *B. cyaneo-fluorescens* ni pour *B. syncyaneus*.

Au point de vue sérologique, comme au point de vue biologique, *B. Le Monnieri* et les Bacilles du lait bleu offrent une certaine parenté.

Précipitation par les acides

La précipitation par les ions H^+ (HCl) différencie nettement les suspensions de *B. Le Monnieri* de celles de *B. syncyaneus* et de *B. cyaneo-fluorescens*.

POUVOIR ANTIGÈNE

Bien que non pathogène, *B. Le Monnieri* est un assez bon antigène. Cependant les complexes fixateurs : *B. Le Monnieri* + sensibilisatrice *B. Le Monnieri* ont une avidité assez faible pour l'alexine (LASSEUR).

B. CARYOCYANEUS Beijerinck-Dupaix 1930 ⁽¹⁾

« En 1927 la National Collection of Type Cultures Listers Institut de Londres adressa une culture d'un Bacille fluorescent, portant la dénomination de *B. caryocyaneus* Delft, à M. le Professeur LASSEUR, qui désireux d'avoir des renseignements sur ce Bacille écrivit à M. le Professeur KLUYVER. Celui-ci répondit en ces termes:

« ...je regrette infiniment de ne pouvoir vous donner de renseignements « sur *B. caryocyaneus*. Je suis assez sûr que M. le Professeur BEIJERINCK, qui a isolé ce microbe et lui a donné son nom, n'a jamais pu « blié un article à ce sujet. J'ai écrit à M. BEIJERINCK pour lui demander de me donner quelques informations. Peut-être alors me sera-t-il « possible de revenir à votre question... »

Et en effet dans une seconde lettre, M. le Professeur KLUYVER précise de la façon suivante les renseignements fournis par son éminent devancier:

« *Ps. caryocyaneus* est étroitement apparenté à *Ps. pyocyaneus* GES- « SARD, mais constitue pourtant une espèce différente. J'ai isolé cette « Bactérie de bois pourri d'un saule, aux environs de Delft. En outre, « j'ai trouvé cette Bactérie quelquefois dans le moût d'une usine de le- « vure et dans celui d'une brasserie. Le pigment bleu « caryocyanine » « ressemble beaucoup à la pyocyanine, mais il est très instable et se trans- « forme aisément en un pigment brun foncé. *B. caryocyaneus* fut isolé « sur une plaque appropriée à l'isolement de l'*Azobacter*. Ainsi j'obtenais « des centaines de petites colonies fortement liquéfiantes et montrant un « pigment bleu foncé. Pour obtenir le pigment bleu il est préférable d'u- « tiliser des plaques d'eau de conduite gélifiée, contenant 2 % de glucose « et 1 % de phosphate d'ammonium, mais là aussi une coloration en brun « se manifeste après quelques temps (BEIJERINCK) « (2).

Sur les conseils et sous la haute direction de M. le Professeur LASSEUR, A. DUPAIX a entrepris l'étude détaillée de *B. caryocyaneus* et ce sont les caractères du germe isolé par BEIJERINCK qui sont résumés ici.

(1) Pour la rédaction concernant *B. caryocyaneus*, nous avons fait de larges emprunts au remarquable travail publié en 1933 par notre collègue A. DUPAIX. (Voir la planche I à la fin du volume.)

(2) In DUPAIX, 1933.

B. caryocyaneus est un bâtonnet non sporulé à bouts arrondis à condensations polaires, présentant des formes courtes ovalaires et des formes allongées quelquefois réunies en diplobacilles. Il mesure de $0\ \mu\ 8$ à $3\ \mu\ 6$ de long sur $0\ \mu\ 5$ à $0\ \mu\ 7$ de large. La durée d'une génération varie de 45 minutes à 67 minutes. Il est mobile et possède un fouet dont la longueur peut osciller de $2\ \mu\ 5$ à $8\ \mu$.

Son mouvement rapide est intermédiaire entre le mouvement du *Vibrio* chlorique et celui du *Bacille* typhique. Il ne peut être étudié que dans un milieu dont la viscosité est suffisante pour ralentir la vitesse de déplacement. Ainsi dans le liquide de peptonisation de l'albumine, on voit les plastides se déplacer suivant un mouvement de translation combiné avec des oscillations latérales. Parfois un pôle de la plastide est au repos, tandis que l'autre extrémité est animée d'un mouvement et semble décrire un cône. Dans le cas des diplobacilles, la plastide postérieure est réunie à la plastide antérieure par un plasmodème. Elle est agitée violemment et paraît aussi décrire un cône de révolution.

Colorées par la méthode de GRAM, les plastides de *B. caryocyaneus* sont décolorées (100 %) en 5 secondes, tandis que *Staphylococcus aureus*, traité dans les mêmes conditions de coloration offre encore 92 % de plastides colorés en violet bleu et 8 % colorés en rouge après 60 minutes d'action du décolorant (1).

CARACTÈRES DE CULTURE

Bouillon, eau peptonée. — En bouillon ordinaire, *B. caryocyaneus* détermine un trouble de toute la masse liquide. Les cultures montrent en outre un voile irisé, lisse, grimpant et une fluorescence verte. Sur eau peptonée, les cultures ont sensiblement le même aspect que sur bouillon, mais la fluorescence paraît plus accentuée..

Lait. — *B. caryocyaneus*, cultivé sur lait, donne un voile bleu noir, grimpant aux parois du tube et surmontant la couche crémeuse qui reste blan-

(1) Il est à remarquer que la coloration de GRAM a été effectuée avec des solutions de violet stabilisées suivant la technique de Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (1931).

che. A cette couche fait suite une zone gris bleu dont l'intensité colorante va en décroissant, puis apparaissent des stratifications de zones claires et foncées. *B. caryocyaneus* ne coagule pas le lait, mais le peptonise après cinq jours de culture en donnant un liquide gris ardoise.

MILIEUX SOLIDES

Gélose-bouillon ou gélose-peptone.

1° *En pigûre.* — Sur gélose *B. caryocyaneus* donne une culture blanc grisâtre, présentant une fluorescence verte. A mesure que les cultures vieillissent, un pigment brun diffuse dans la gélose.

2° *Sur plaques.* — Les colonies arrondies, blanchâtres sont de trois types différents :

- a) bombées, lisses ;
- b) à bords surélevés, centre plissé ;
- c) plates, très plissées.

Gélatine. — *B. caryocyaneus* est un germe doué d'un pouvoir protéolytique intense. Sur gélatine, et après 18 heures de culture, on observe au point d'inoculation un début de liquéfaction en entonnoir, puis la liquéfaction progresse par tranches. La gélatine liquéfiée est très fluorescente.

Albumine d'œuf. — *B. caryocyaneus* attaque aussi l'albumine d'œuf. Après six jours, la peptonisation d'un cube d'albumine d'un centimètre de côté est complète. On obtient alors un liquide visqueux, présentant une fluorescence vert jaune avec léger brunissement.

Sérum de cheval coagulé. — *B. caryocyaneus* protéolyse aussi le sérum de cheval coagulé et colore le milieu en gris vert.

Pomme de terre. — *B. caryocyaneus* se développe bien sur pomme de terre ; les tubercules sont recouverts d'une culture gris bleu, devenant vert noir et enfin noir cirage à reflets métalliques. Le coton supportant les tubercules offre des teintes dégradées, allant du noir au gris vert, gris bleu.

Carotte. — Sur carotte, la culture est mince, humide, gris noirâtre à reflets verts.

Dahlia. — Sur dahlia, *B. caryocyaneus* se développe moins abondam-

ment que sur pomme de terre ou sur carotte. Quelques tubercules restent pratiquement incolores, d'autres présentent une teinte à peine fumée ou gris ardoise.

MILIEUX SPÉCIAUX

Eau peptonée nitratée. — Cultivé en eau peptonée nitratée, *B. caryocyaneus* réduit les nitrates en nitrites. La réaction de GRIESS donne une coloration rose très nette, quelle que soit la souche employée. Il est à remarquer que la réduction ne va jamais jusqu'à un dégagement d'azote.

Eau peptonée rouge neutre. — Sur eau peptonée rouge neutre, on n'observe pas de variation nette de la coloration du milieu, tout au plus perçoit-on une teinte pruneau accompagnée d'une précipitation de la matière colorante.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

MILIEU I DE LASSEUR

Le milieu le plus favorable au développement et à la manifestation de la fonction chromogène de *B. caryocyaneus* est le milieu synthétique I de LASSEUR. Sur ce milieu, la Bactérie donne tout d'abord (après 24 heures) un voile blanc, mince, grimpant et une fluorescence verte. Seule la partie supérieure de la colonne liquide montre une coloration verte sur une hauteur d'environ 2 millimètres. Cette coloration gagne en profondeur avec l'âge de la culture et après 48 heures, la coloration s'étend sur 10 à 12 millimètres; c'est à ce moment que le pigment bleu apparaît. A partir de ce stade de l'évolution de la culture, le pigment bleu masque la fluorescence verte. La culture âgée de quinze jours montre un voile plissé grisâtre bordé de noir; le liquide est coloré en bleu intense et par transparence on perçoit une coloration violet rouge. Les cultures âgées de vingt-cinq jours sont noires par réflexion et brun rouge par transparence.

Nous ne dirons que deux mots sur la réaction du milieu: en milieu LI la concentration en ions H^+ + la plus favorable au développement et à la production de la fluorescence est $pH = 7,2$, tandis que $pH = 6$ paraît être plus favorable à l'apparition du pigment bleu violet.

MILIEU II DE LASSEUR

Sur milieu synthétique II de LASSEUR, *B. caryocyaneus* détermine l'apparition d'une magnifique coloration passant du bleu au violet, puis au noir suivant l'âge de la culture.

La présence du fer est indispensable à la manifestation de la chromogénèse de *B. caryocyaneus*. En milieu non additionné de fer, *B. caryocyaneus* offre un développement plus faible qu'en milieu normal. De plus, dans ces conditions, on n'observe jamais la coloration bleu violet ou violet rouge caractéristique de *B. caryocyaneus*.

ACTION DU MAGNÉSIUM

En l'absence de magnésium, la fonction fluorescigène de *B. caryocyaneus* ne peut se manifester.

Dans les cultures incolores ou jaunâtres effectuées en milieu non additionné de magnésium, l'apport tardif de ce métal fait apparaître instantanément la fluorescence verte.

B. caryocyaneus a servi de matériel d'étude à Ph. LASSEUR, G. THIRY, A. DUPAIX et M. OLIVIER dans leurs recherches sur l'influence du magnésium et d'autres métaux sur la fonction fluorescigène.

INDOL

Etudié comparativement avec le Colibacille et quelle que soit la composition du milieu de culture utilisé, *B. caryocyaneus* ne donne pas d'indol.

H²S

En milieu peptoné additionné ou non de soufre, *B. caryocyaneus* produit un dégagement d'H²S qui peut être mis en évidence par la formation de bleu de méthylène.

TEMPÉRATURE

Température de culture. — La température optimum de culture de *B. caryocyaneus* est comprise entre 22° C. et 25° C. Cependant il se développe à 39°-40° C. Au premier passage à 39° C. 10 % des tubes montrent un développement; au deuxième passage 100 % des tubesensemencés offrent une végétation normale, mais la Bactérie ne sécrète aucun pigment à cette température.

Température mortelle. — L'action des températures nocives sur les Bactéries ne peut « se ramener à l'énoncé d'une température mortelle mais

à l'établissement des températures mortelles en fonction du temps de chauffage » (A. DUPAIX 1933).

C'est ainsi que les plastides de *B. caryocyaneus* sont détruites par un chauffage de 32 minutes à 51° C., 10 minutes à 56° C., 4 minutes à 58° C. et une minute à 62° C.

ODEUR

Toutes les cultures de *B. caryocyaneus* dégagent une odeur putride accentuée.

OXYGÈNE

B. caryocyaneus ne se développe pas dans un milieu dépourvu d'oxygène. Après sept jours de culture dans ces conditions, la Bactérie n'est pas morte; elle reprend son développement dès qu'on la met en contact avec l'oxygène.

En présence de pressions de plus en plus réduites d'oxygène, A. DUPAIX (1933), a obtenu « toutes les images intermédiaires entre celle de la culture en atmosphère limitée et celle de la culture en présence de gaz inerte ».

ANTISEPTIQUES

Dans les milieux phéniqués à 0,25/1000, *B. caryocyaneus* se développe normalement; la végétation devient irrégulière à la concentration de 0,50/1000 et tout développement microbien cesse quand la concentration du milieu atteint 0,75/1000 d'acide phénique.

ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE

B. caryocyaneus fait fermenter le glucose, le galactose, le xylose et l'arabinose. En ce qui concerne le glucose, la fermentation rapide est suivie d'une alcalinisation du milieu.

PRÉCIPITATION DES SUSPENSIONS

Les suspensions de *B. caryocyaneus* sont très stables vis-à-vis des ions H⁺, c'est ainsi qu'après addition de doses croissantes d'acide chlorhydrique, seuls les systèmes correspondant à la concentration en acide chlorhydrique N/256, sont précipités.

PROPRIÉTÉS ANTIGÈNES

Bien que n'étant pas un germe pathogène, *B. caryocyaneus* est doué d'un pouvoir antigène très élevé. La dilution limite d'agglutination du sérum de Lapin, préparé avec *B. caryocyaneus*, est de l'ordre de 1/100.000 (après 4 heures de séjour à 37° C.). L'origine de *B. caryocyaneus* ne laissait pas prévoir à priori un pouvoir agglutinogène aussi élevé.

B. caryocyaneus constitue un matériel éminemment favorable à l'étude du mécanisme du phénomène de CHARRIN et ROGER. Cette particularité a été mise à profit par Ph. LASSEUR et A. DUPAIX dans leurs recherches sur le mécanisme de l'agglutination sérique des Bactéries.

POUVOIR FIXATEUR

Dans les conditions d'expériences adoptées par A. DUPAIX (1933), 1 cm³ de sérum *B. caryocyaneus* fixe 30 unités hémolytiques; « on est donc étonné de la disproportion qui existe entre le pouvoir agglutinant et le pouvoir sensibilisant du sérum *B. caryocyaneus* » (A. DUPAIX 1933).

POUVOIR PATHOGÈNE

L'injection intrapéritonéale ou intraveineuse de cultures de *B. caryocyaneus* ne détermine aucun trouble appréciable chez le lapin, le cobaye, la souris blanche et la grenouille. Par contre le pouvoir pathogène pour les larves de *Galleria mellonella* est indéniable.

En effet, 20 heures après l'inoculation de 1/100 de cm³ de suspensions de *B. caryocyaneus*, de concentration décroissante en Bactéries, A. DUPAIX est arrivée aux résultats ci-dessous :

Suspension de concentration 4 C :	animaux morts 100 %
Suspension de concentration 2 C :	animaux morts 100 %
Suspension de concentration C :	animaux morts 60 %
Suspension de concentration C/2 :	animaux morts 20 %

Mais l'auteur fait remarquer que le pourcentage de 100 % est atteint avec les deux dernières concentrations, après 24 heures.

B. caryocyaneus ayant été isolé par BEIJERINCK du bois pourri d'un Saule, A. DUPAIX a été naturellement conduite à rechercher le pouvoir pathogène de ce germe sur différents végétaux, en particulier sur le Bégo-

nia, Pelargonium, Geranium et Opuntia. *B. caryocyaneus* s'est montré dépourvu de virulence pour ces différentes plantes.

Etant donné les qualités antigéniques de *B. caryocyaneus*, Ph. LASSEUR, P. DOMBRAY et A. DUPAIX ont recherché si la Bactérie était capable de déterminer la production d'agglutinines chez Opuntia.

Il résulte de leurs essais que l'agglutination n'a pas lieu avec le suc d'Opuntia inoculé pour les dilutions variant de 1/3 à 1/16; seule la dilution au 1/2 pourrait donner lieu à des interprétations différentes. Le nombre des causes d'erreur possibles étant très grand, le facteur personnel pouvant intervenir pour une trop large part dans des réactions aussi peu intenses, les auteurs n'ont pu conclure à la formation d'anticorps chez Opuntia.

Tels sont les caractères morphologiques, cultureux et sérologiques de *B. caryocyaneus*. Il ne faut cependant pas oublier que grâce à une technique spéciale, Ph. LASSEUR, J.-G. MARCHAL et A. DUPAIX (1931) ont obtenu des races dégradées de cette Bactérie :

1° Une race fluorescente verte ne produisant plus de pigment bleu, bleu-violet ou violet-rouge.

2° Une race achromogène.

L'ensemble des caractères morphologiques, physiologiques et sérologiques des races ainsi obtenues n'est pas sensiblement modifié.

BACILLE BLEU DE MILDENBERG 1922

Ce germe a été décrit en 1922 par HERMANN MILDENBERG, qui en a étudié un certain nombre de souches. Il provenait de l'air et possédait la propriété de donner un pigment bleu sur les milieux nutritifs. MILDENBERG l'a comparé à une souche de *B. cyanogenus* provenant de Munich.

Le Bacille bleu de MILDENBERG est un bâtonnet épais, court, ovale, à peine plus long que large : ce qui le fait confondre avec des cocci.

C'est un germe aérobie.

MOTILITÉ

Le Bacille étudié par MILDENBERG est un germe mobile. Il possède un ou plusieurs fouets qui sont toujours polaires.

COLORABILITÉ

Le germe de MILDENBERG se colore par le violet de gentiane phéniqué et par toutes les couleurs d'aniline. Le Bacille bleu ne prend pas le Gram.

Dans des cultures d'au moins quatre jours, MILDENBERG n'a pu colorer de spores par la méthode de MØLLER.

TEMPÉRATURE

La température du Laboratoire paraît plus favorable au développement du Bacille bleu, qui pousse bien néanmoins à des températures supérieures et inférieures.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Sur plaque de gélatine bouillon acide ou sur plaque de gélatine bouillon neutre, le Bacille bleu de MILDENBERG détermine une liquéfaction lente avec une coloration jaune vert.

Il en est de même sur plaque de gélatine bouillon acide additionnée de peptone et de glycérine (cette dernière dans la proportion de 1,5 %).

Lorsque la réaction de ce dernier milieu est neutre, on observe la succession des teintes suivantes : bleu violet, bleu clair, bleu vert foncé, bleu vert.

Gélose. — Sur plaques de gélose bouillon peptone glycinée à 1,5 %, et alcalinisée faiblement, le Bacille bleu donne des colonies brillantes, filamenteuses, de couleur bleu acier virant au bleu foncé, puis au violet pourpre. Après trois ou quatre semaines le pigment devient bleu vert, puis vert et pâlit peu à peu par la suite.

L'agar bouillon peptone glyciné à 1,5 % et incliné paraît être le milieu le plus favorable pour le Bacille bleu.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre le Bacille bleu de MILDENBERG trouve un excellent milieu de développement, en même temps qu'un substratum très favorable à la production de son pigment.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — En bouillon peptoné le Bacille bleu donne d'abord un trouble faible, puis présente un dépôt gris avec parfois formation d'une pellicule. Le trouble s'accroît, le liquide se teinte faiblement en jaune vert et présente une odeur aromatique désagréable.

Sur bouillon nutritif glucosé à 2 %, le Bacille de MILDENBERG se développe bien mais ne colore pas le milieu liquide.

Lait. — Ensemencé sur lait stérilisé, le Bacille bleu de MILDENBERG détermine une coagulation partielle avec production d'une belle coloration bleue. Le lait non caillé reste incolore.

MILIEU SYNTHÉTIQUE DE HUEPPE

Ensemencé dans le milieu de HUEPPE, le Bacille de MILDENBERG ne donne pas de pigment.

POUVOIR PATHOGÈNE

Le Bacille bleu de MILDENBERG n'est pas pathogène.

PIGMENT

Le pigment du Bacille bleu est facilement soluble dans l'eau et la glycérine, plus difficilement dans l'alcool.

Il est insoluble dans le chloroforme, la benzine, l'alcool amylique, l'éther et le sulfure de carbone.

La solution violette du pigment bleu vire au rouge sous l'action de l'acide chlorhydrique, au vert sous celle de la soude, et au bleu-violet sale en présence de l'ammoniaque.



CHAPITRE VI

GERMES DU GROUPE MESENTERICUS SUSCEPTIBLES DE PRODUIRE UN PIGMENT SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

B. MESENTERICUS FUSCUS Flugge 1886 ⁽¹⁾

B. mesentericus fuscus FLUGGE. *B. mesentericus* (FLUGGE) LEHMANN et NEUMANN. *B. mesentericus fuscus* BERGEY 1923. *B. mesentericus* (FLUGGE) MIGULA. Bacille brun de la pomme de terre.

Bacillus mesentericus est un germe très commun; on le trouve dans l'air, l'eau, le sol, les excréments humains, sur les plantes. De par sa présence dans tout ce qui se rapporte plus ou moins à la vie de l'homme ou de l'animal, on conçoit son ubiquité.

METCHNIKOFF (1914) le signale dans les selles des nourrissons atteints de diarrhée infantile.

BRAILOWSKY et LOUNKEWITCH (1915) le considèrent comme un hôte normal de la flore buccale qui apparaît dès après la naissance.

PEREZ (1897) signale sa présence dans le système lymphatique ganglionnaire.

VOLKOWITCH (1897) montre sa présence sur la conjonctive de l'homme.

COYON (1900) isole de l'estomac un germe se présentant tantôt sous forme végétative tantôt à l'état de spores.

MORPHOLOGIE

B. mesentericus fuscus est un bâtonnet grêle et court.

Des mesures effectuées par ROLIN (1929) sur une souche de *B. mesen-*

(1) Pour la rédaction de ce chapitre nous avons fait de larges emprunts au travail de P. THOMAS (1930): *Etude comparative de Bacillus mesentericus fuscus* FLUGGE et de *Bacillus mesentericus niger* LUNT, Thèse Pharmacie, Nancy.

tericus fuscus (souche PRIBRAM), il résulte que ce germe, cultivé sur différents milieux à la température de 37° C., voit sa longueur varier de 1 μ 9 à 2 μ 8 et sa largeur osciller entre 0 μ 6 et 0 μ 8.

Il se présente par groupes de deux à quatre éléments (FLUGGE).

MOTILITÉ

En culture jeune sur eau peptonée, *B. mesentericus fuscus* montre des mouvements très vifs.

FOUETS

En appliquant les méthodes de travail et de coloration exposées dans la thèse de FRACHE (1926), LASSEUR, THOMAS et ZAHL (inédit), par la méthode de Van ERMINGEN modifiée par Ph. LASSEUR ont mis en évidence des fouets de deux à quatre spires. Leur longueur est en général égale à celle de la plastide. Leur nombre ne paraît pas dépasser quinze et les éléments possédant seulement quelques fouets sont assez rares.

COLORATION DES PLASTIDES

Examinées entre lame et lamelle les plastides nous apparaissent sous la forme de bâtonnets incolores.

COLORABILITÉ

B. mesentericus fuscus, comme tous les germes du groupe *subtilis mesentericus*, est facilement colorable par les colorants d'aniline (bleu de méthylène, toluïdine, vert malachite).

Il prend le Gram. Si on fait intervenir la vitesse de décoloration on obtient les temps suivants :

Culture de 24 heures : 70 minutes ;

Culture de 48 heures : 80 minutes (Ph. LASSEUR et SCHMITT, 1927).

REPRODUCTION

B. mesentericus fuscus se reproduit par scissiparité et par formation de spores. A la suite de ses expériences THOMAS a trouvé que sur eau peptonée à pH = 7,5 les premières spores apparaissent vers la dix-huitième heure de culture elles se développent peu à peu à l'intérieur du bâtonnet et semblent se libérer définitivement vers la quarantième heure de séjour à l'étuve à 37° C.

Les spores sont petites, ovales, brillantes, irrégulièrement disposées (EISENBERG, MIGULA, FLUGGE, MACÉ); elles sont incolores et très réfringentes.

Elles sont tuées par chauffage à 100° C. pendant une 1/2 heure (MIGULA). Au neuvième jour de culture, époque où la spore est arrivée à son complet développement, elle mesure 1 μ 4 sur 0 μ 7. La germination se produit en 4 à 5 heures, elle est équatoriale (LASSEUR, LASSEUR et VERNIER). Sur milieu solide (carotte à 37° C.) la sporulation débute en moyenne vers la quatorzième heure. La valeur nutritive du milieu solide, l'humidité du milieu, influent sur la sporulation, que le milieu solide favorise davantage.

En dehors du milieu, la pression, la dessiccation, la chaleur agissent sur la formation des spores.

La méthode d'ALESSANDRINI modifiée par THOMAS est la méthode la plus fidèle et la plus sensible pour la coloration des spores. C'est un procédé de choix.

ACTION PATHOGÈNE

B. mesentericus fuscus est un saprophyte banal. On a constaté sa présence, en association avec d'autres germes, dans certains cas pathologiques des plaies de guerre (TISSIER, LEVADITI, FIESSINGER et BARRIEN, CARLOS RAMALHAO, 1916).

Ce germe appartient au groupe de Bactéries déterminant la carie dentaire. Le Bacille de la gangrène de la pulpe dentaire en paraît très voisin. On le rencontre dans les cas d'inflammation du pis des génisses et des chèvres (GUILBEAU, 1892).

AÉROBIOSE

Ce germe est un aérobie; il se cultive facilement sur tous les milieux de culture.

TEMPÉRATURE

Il se développe à la température ordinaire, mais plus rapidement à 37° C. Sa croissance est entravée entre 52° et 57° C. Les plastides perdent toute vitalité par chauffage à 80° C. pendant 20 minutes.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Sur gélatine *B. mesentericus fuscus* donne des colonies minces, plates, irrégulières, de structure granuleuse, formées de cellules isolées ou de chaînettes très courtes (in. THOMAS).

Après 24 heures de culture les colonies sont blanchâtres à contour net (observées à un faible grossissement) et à expansions filamenteuses et ténues. A ce stade qui précède la liquéfaction les colonies deviennent brunes à surface finement granuleuse (FLUGGE, EISENBERG, MIGULA, MACÉ).

Par la suite il se forme un trouble blanchâtre le long du canal d'inoculation, et en même temps un entonnoir de liquéfaction s'étend peu à peu jusqu'aux parois du tube. La couche liquide superficielle contient en suspension des flocons gris blanchâtres.

Gélose. — Ensemencé en strie sur gélose *B. mesentericus fuscus* donne une culture blanchâtre, devenant gris brunâtre, rugueuse, ratatinée.

Pomme de terre. Carotte. — Au bout de 24 heures de culture, il se forme une couche blanche, lisse dont la surface se ride bientôt et prend ensuite une coloration brune. Cette formation s'étend en surface.

Artichaut. — Sur artichaut, les colonies se développent rapidement avec production d'un pigment vert.

Pain. — Le pain ensemencé avec *B. mesentericus fuscus* prend une odeur désagréable et un aspect caractéristique connu sous le nom de « *pain filant* » (JUCKENACK 1900, VOGEL 1898). Il se forme une couche brunâtre, collant aux doigts, s'étirant en fils brillants sur plusieurs décimètres et ressemblant aux fils d'araignée.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Eau peptonée. — Lorsqu'on ensemence *B. mesentericus fuscus* sur bouillon et sur eau peptonée, le milieu se trouble en moins de 24 heures; le liquide se recouvre d'un voile léger se plissant et épaississant par la suite. Le huitième jour le voile tombe et se désagrège lentement.

INDOL

Dans les expériences de THOMAS effectuées après ensemencement du germe sur eau peptonée dont le pH varie de 4,4 à 9,8, après 48 heures de

séjour à 37° C., *B. mesentericus fuscus* ne donne pas d'indol (recherches effectuées par la méthode de SALKOWSKI).

ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE

L'action des Bactéries du groupe *subtilis-mesentericus* sur les glucides a été étudiée en 1896 par PÉRÉ. Les hydrates de carbone et les alcools polyatomiques sont détruits, suivant leur constitution. Un sucre à trois atomes de carbone fait virer à gauche le plan de polarisation. Ce sucre est brûlé pour donner de l'aldéhyde formique.

DESMOTZ (1904), aensemencé *B. mesentericus fuscus* sur milieux additionnés de glycérine, mannite, glucose, saccharose, dextrine, inuline, amidon ou pomme de terre. Après un certain temps il a constaté qu'il y avait disparition totale des sucres, production d'acide acétique, valérianique, d'alcool et hydrogène et par distillation il obtenait un liquide réducteur, analogue à l'acétylméthylcarbinol.

Ces travaux sont confirmés par ceux de HARDEN et NORRIS (1912) et de LEMOIGNE (1912-1913).

CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES

B. mesentericus fuscus se comporte comme un antigène médiocre; c'est ainsi que le sérum d'un animal préparé avec les formes végétatives de ce germe, n'offre comme dilution limite d'agglutination que le 1/250 sur les formes végétatives.

Les spores chauffées à 115° C. jouissent d'un pouvoir agglutinatif un peu plus élevé puisque le sérum homologue offre une dilution limite du 1/600.

Pour une étude plus approfondie nous renvoyons le lecteur aux travaux de LASSEUR, HURIET et MOREL (1928) (1).

(1) Ph. LASSEUR, HURIET et MOREL: *Agglutination des Bactéries du groupe subtilis mesentericus*. Trav. du Labor. de Microbiol. Fasc. I, 1928, p. 5.

B. MESENTERICUS NIGER Lunt 1896

B. mesentericus niger LUNT 1896. *B. aterrimus* (BIEL, 1896) LEHMANN et NEUMANN. *B. lactis niger* GORINI 1896. *B. aterrimus tschitensis* KLIMENKO 1908. *B. niger* (GORINI) MIGULA 1894 in. BERGEY 1923.

B. mesentericus niger a été isolé du pain dont la croûte présentait des taches noires et de la flore microbienne de l'eau.

Ses caractères se rapprochent beaucoup de ceux de *B. mesentericus fuscus*.

MORPHOLOGIE

B. mesentericus niger se présente sous la forme de bâtonnets rectilignes à extrémités arrondies. Les éléments sont, la plupart du temps, isolés; quelquesfois ils sont groupés par deux, rarement en chaînettes.

Les plastides ont $2\ \mu\ 8$ à $3\ \mu\ 6$ de long sur $0\ \mu\ 8$ de large (EISENBERG, 1891).

W. PALGEN (1925) dans sa thèse remarquable a étudié les variations des dimensions des plastides de *B. mesentericus niger*. De ses recherches il résulte qu'en neuf jours la longueur (dimension moyenne) passe de $2\ \mu\ 6$ à $2\ \mu$ et le rapport de LASSEUR $\frac{L}{l}$ varie de 3,25 à 2,5.

MOTILITÉ

Ce germe est très mobile et présente des mouvements vifs, rotatoires ou oscillatoires provoqués par des fouets pérित्रiches (MIGULA).

FOUETS

Les fouets sont au nombre de trois à seize, répartis sur toute la longueur de la plastide. Ils ont de deux à cinq spires serrées ou lâches. Leur longueur est variable, tantôt deux à trois fois plus longs que la plastide (plastide jeune courte) tantôt ils ne dépassent pas la longueur de celle-ci (LASSEUR, VERNIER et A. DUPAIX inédit).

Les plastides de *B. mesentericus fuscus* ont généralement plus de fouets que celles de *B. mesentericus niger*.

Examinées à l'état frais elles apparaissent incolores et très réfringentes.

COLORABILITÉ

B. mesentericus niger est facilement colorable par les colorants usuels. Il prend le Gram.

Le temps de décoloration établi par LASSEUR et SCHMITT (1927) est de

40 minutes pour les cultures de 24 heures

50 minutes pour les cultures de 48 heures.

SPORES

Les spores sont endogènes, ovales, placées au milieu du Bacille (EISENBERG, MIGULA, FLUGGE, MACÉ). Elles sont incolores et très réfringentes.

D'après BEIJERINCK les spores cultivées sur carotte à 37° C. ont une longueur moyenne de 1 μ 3 sur 0 μ 7 de large. Ces dimensions sont très voisines pour ne pas dire égales à celles indiquées pour les spores de *B. mesentericus fuscus*. Ce caractère ne peut donc pas servir à la différenciation de ces deux espèces.

Les spores se colorent admirablement bien par la méthode d'ALESSANDRINI.

AÉROBIOSE

B. mesentericus niger est un germe aérobic ; il se développe facilement sur tous les milieux usuels.

TEMPÉRATURE

La température optimum pour le développement de *B. mesentericus niger* est de 37° C. A cette température il donne rapidement d'abondantes cultures.

A 50° C. et au-dessus, les cultures sont entravées dans leur développement. Les plastides sont tuées après chauffage de 20 minutes à 80° C.

CARACTÈRES DE CULTURE

B. mensentericus niger se cultive de préférence sur les milieux alcalins. Sur gélatine faiblement acide, la croissance est sensiblement retardée. Toutefois si la croissance se fait encore à 37° C. quand le milieu est peu acidifié, elle s'arrête totalement quand il faut ajouter, pour neutraliser le milieu, plus de 2 % de soude (MIGULA, BIEL 1896).

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. — Sur gélatine, *B. mesentericus niger* donne des colonies irrégulières, grises, granuleuses.

Au troisième ou quatrième jour de culture la liquéfaction commence ; puis rapidement la gélatine liquéfiée prend une couleur grise.

En piqûre, la liquéfaction en godet progresse peu à peu et atteint les bords du tube. Il se forme une pellicule à la surface de la gélatine liquéfiée. La végétation ralentit dans la partie inférieure du tube et une addition de 2 % de glucose l'arrête complètement.

Gélose. — En strie, il se forme en surface une peau plissée jaune brunâtre. La gélose brunit, puis noircit.

En piqûre, le développement se fait dans la partie supérieure du tube. La gélose glucosée favorise plus la coloration brune que la gélose pure.

Pomme de terre et carotte. — Ensemencé sur pomme de terre et carotte, *B. mesentericus niger* se développe abondamment. Il donne une culture d'abord gris bleuâtre qui passe au noir et envahit tout le substratum. Cette culture, plissée, finement chagrinée, est humide. En neutralisant le milieu, le développement est accéléré ; la masse bactérienne est plus visqueuse et il se forme sur l'eau de condensation, un voile plissé coloré en brun noir.

Pain stérile (noir ou blanc). — A 37° C. après quelques jours il y a production d'un pigment noir foncé. Sur la surface du milieu se forme une pellicule noire, plissée, humide et résistante. Le développement du *Bacille* est plus rapide et plus intense si l'acidité assez grande du pain est neutralisée au préalable.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon-Eau peptonée. — *B. mesentericus niger*, ensemencé sur ces milieux, donne un voile plissé à la surface, s'épaississant lentement, puis tombant au fond où il se désagrège.

Lait. — Le lait est coagulé après 24 à 36 heures de séjour à l'étuve à 37° C. sans production d'acide lactique. L'acidité du milieu ne varie pas. Il y a ensuite peptonisation. Dans le fond du tube il se forme un dépôt noir brunâtre.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Ph. LASSEUR et G. THIRY, BROQUIN LACOMBE ont cultivé *B. mesentericus niger* sur les milieux synthétiques de LASSEUR.

Sur milieu synthétique L1 *B. mesentericus niger* donne une coloration rose, bleue ou noire.

Sur milieu synthétique L2, il donne une coloration bleue.

ROLE DU MAGNÉSIUM

Le rôle du magnésium dans la chromogénèse de *B. mesentericus niger* a été particulièrement bien étudié par W. PALGEN 1925. Cet auteur a montré qu'en l'absence de magnésium les cultures effectuées ne dépassent pas le stade violacé, tandis que dans le milieu complet, c'est-à-dire en présence de magnésium, le voile est noir et le liquide devient noir foncé après cinq jours de culture.

INDOL

B. mesentericus niger ne donne pas d'indol (THOMAS 1930).

ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE

B. mesentericus niger, ensemencé sur milieux additionnés de glycérine, mannite, glucose, saccharose, dextrine, inuline, amidon ou pomme de terre (DESMOTS), fait disparaître totalement ces sucres, avec production d'acide acétique, valérianique, d'alcool éthylique, etc...

Par distillation, DESMOTS obtenait un liquide réducteur levogyre, analogue, par ses propriétés chimiques à l'acétylméthylcarbinol.

CARACTÈRES ANTIGENIQUES

B. mesentericus niger se comporte comme un antigène bien supérieur à *B. mesentericus fuscus* puisqu'il est possible d'obtenir avec lui une agglutination avec le sérum homologue dont la dilution limite est voisine de 1/1600.

Les spores de *B. mesentericus niger* chauffées à 115° C. ont un pouvoir antigénique assez élevé; dans certains cas elles permettent d'obtenir un sérum dont le pouvoir agglutinant homologue est de 1/1000.

Ph. LASSEUR, HURIET, et MOREL (1928) ont montré que l'agglutination des germes sporogènes pouvait être envisagée au point de vue des affinités sérologiques des Bactéries du groupe *subtilis mesentericus*. C'est ainsi qu'ils ont obtenu des sérums-formes végétatives *B. mesentericus niger* qui agglutinaient les formes végétatives de :

B. mesentericus niger au 1/1600 ;

B. subtilis au 1/100 ;

B. megatherium au 1/200.

PIGMENTS

PRODUITS PAR *B. MESENTERICUS FUSCUS* ET PAR *B. MESENTERICUS NIGER*

1° PAR *B. MESENTERICUS FUSCUS*

SUR MILIEUX USUELS

Sur pomme de terre *B. mesentericus fuscus* donne un enduit luisant, grisâtre, se plissant peu à peu : puis il fonce et donne dans les vieilles cultures un voile brun ridé (EISENBERG, MIGULA, LASSEUR).

SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Les milieux synthétiques de LASSEUR ayant donné des résultats remarquables dans la culture des Bactéries chromogènes, LASSEUR et THIRY (1913) ont recherché dans quelle mesure les milieux nutritifs de LASSEUR pouvaient être utilisés pour la mise en évidence de la fonction chromogène chez les germes sporulés. Nous ne relaterons ici que les expériences relatives à *B. mesentericus fuscus*.

Au cours de ces expériences ils ont obtenu des colorations variables suivant les espèces cultivées. Ces microorganismes étaient capables de produire diverses colorations en milieux synthétiques de composition chimique bien définie.

a) Sur milieu L1 à 35°-37° C., on obtient avec *B. mesentericus fuscus* (souche KRAAL) un voile rose, puis rouge brique se développant à la surface du milieu. Le liquide de culture prend une coloration rose rouge violacé qui ne s'accroît que très légèrement.

b) Sur milieu L2 à 35°-37° C., *B. mesentericus fuscus* (souche KRAAL) donne un voile rose rouge brique. Le liquide est légèrement coloré en rose.

2° PAR *B. MESENTERICUS NIGER*

Sur pain, *B. mesentericus niger* donne naissance à un pigment noir.

Sur gélatine et gélose il donne une coloration jaunâtre, qui brunit et noircit peu à peu (EISENBERG, MIGULA).

Ce pigment n'a pu (THOMAS 1930) être extrait par les solvants usuels. L'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme, la benzine, l'iodure de potassium, la glycérine, les bases et les acides organiques ou inorganiques ont été utilisés sans succès dans ce but (BIEL 1896).

SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

B. mesentericus niger a été cultivé sur milieux I et II de LASSEUR par Ph LASSEUR, Ph. LASSEUR et G. THIRY, BROQUIN LACOMBE.

Ces auteurs ont utilisé trois souches de *B. mesentericus niger* provenant des cultures de KRAAL, COURMONT et BEIJERINCK (1912-13).

Nous allons donner ci-dessous un tableau récapitulatif des caractères de ces germes sur milieux synthétiques (d'après LASSEUR et THIRY 1913).

MILIEU I DE LASSEUR

	CULTURES AGÉES DE 6 JOURS	
	Voile	Liquide
<i>B. mesentericus niger</i> (COURMONT ROCHAIX)	blanc puis ardoise	bleu par réflexion, violet par transparence puis noir.
<i>B. mesentericus niger</i> (BEIJERINCK)	blanc puis ardoise	bleu par réflexion, violet par transparence puis noir.
<i>B. mesentericus niger</i> (KRAAL)	blanc puis ardoise	rose puis bleu par réflexion violet par transparence, puis noir.

La production du pigment varie avec la souche expérimentée. C'est ainsi que BROQUIN LACOMBE, après avoir obtenu de belles cultures bleues, n'obtenait plus que des cultures roses. Ce fait trouve son explication dans les races roses et bleues isolées par Ph. LASSEUR et A. DUPAIX.

MILIEU II DE LASSEUR

	CULTURES AGÉES DE 48 HEURES	
	Voile	Liquide
<i>B. mesentericus niger</i> (COURMONT ROCHAIX)	gris bleu puis gris noir	bleu vert puis bleu foncé noir.
<i>B. mesentericus niger</i> (BEIJERINCK)	gris bleu puis noir	bleu vert, bleu foncé puis noir.
<i>B. mesentericus niger</i> (KRAAL)	gris.	bleu puis violet foncé puis gris noir.

Une remarque importante doit être faite; suivant que les cultures sont effectuées à 20° ou 37° C., leur aspect peut être différent. Cette particularité a été mise en évidence pour les souches BEIJERINCK et les souches COURMONT ROCHAIX.

ORIGINE DU PIGMENT PRODUIT DANS LES CULTURES DU *B. MESENTERICUS*

Des auteurs ont cherché l'origine du pigment bleu produit par *B. mesentericus niger* sur milieu synthétique de LASSEUR.

Il est dû probablement à une fixation d'oxygène, fait confirmé par BROQUIN LACOMBE (1913). Cet auteur, sur les données effectuées par LASSEUR, a cultivé *B. mesentericus niger* sur milieu L2 en présence d'air ou d'oxygène (tubes bouchés à la ouate). Il s'est produit un voile grisâtre tandis que le liquide sous-jacent prit à sa partie supérieure, sur 1 à 2 centimètres, une coloration bleue. Le voile s'épaissit, brunit, se plissa, puis devint noirâtre. Le liquide passa du bleu au bleu verdâtre, vert sale, vert brun, brunâtre et enfin noirâtre.

En tubes scellés contenant de l'oxygène, le voile gardait sa coloration grise, et le liquide restait indéfiniment bleu.

« *Il ne faut cependant pas conclure de là, que la production ou l'édification de corps colorés se réduit à des phénomènes d'oxydation. En ce qui concerne la production de chlororaphine il y a à la base un phénomène de réduction* » (LASSEUR).

Les récents travaux de Biologie montrent que LASSEUR avait parfaitement raison lorsqu'il s'efforçait de mettre en évidence les phénomènes d'oxydation et de réduction dans la production des pigments bactériens. C'est ce qui a permis à KÖGL et ELEMA, DHÉRÉ et à tous ceux qui se sont occupés de la chromogénèse de dire que les travaux de LASSEUR sont fondamentaux.

L'oxygène est indispensable à la production du pigment bleu, mais le corps coloré peut être en même temps sous la dépendance de phénomènes de réduction.

ROLE DU FER

De nombreux travaux de E. GRIS (1843), A. GRIS (1857), RAULIN (1870), CUGINI (1876), SCHULTZ (1877), MAYER (1879), MOLISCH (1892), LAPPALAINEN (1919), RUHLAND (1924), LINOSSIER (1889-90-91), SAUTON (1910), LASSEUR (1911), BEIJERINCK (1918), RIPPEL et BORTELS (1927), LASSEUR et ses Collaborateurs (1913-20-24-25-30) ont montré l'importance du fer dans la multiplication et la production des pigments par les micro-

organismes. Certains — le plus grand nombre — ont rapport aux Bactéries, d'autres aux Champignons.

En ce qui concerne l'influence du fer sur la production chromogène des Bactéries, c'est LASSEUR qui le premier (1911) a mis cette action en évidence.

Des expériences effectuées par LASSEUR et résumées par THOMAS en 1930, on déduit que des quantités extrêmement faibles de fer suffisent à la production de la substance déterminant la coloration du milieu. Toutefois pour obtenir la coloration, il faut des quantités de fer relativement importantes, de l'ordre du milligramme.

ROLE DE LA HAUTEUR DE LIQUIDE DE CULTURE

La hauteur du liquide de culture dans les tubes a une influence très grande sur le pouvoir chromogène. Lorsque cette hauteur est trop élevée les cultures se développent comme si le milieu ne contenait pas de fer. A partir d'une certaine hauteur de liquide la coloration ne se produit plus (LASSEUR). Ceci est dû aux causes suivantes :

- 1° dans les milieux L1 et L2 la plus grande partie du fer est précipitée ;
- 2° les Bactéries étudiées se développent surtout en surface. Par suite la production de la substance-mère peut avoir lieu sans que la culture soit colorée. La colonne de liquide étant haute, le coefficient de diffusion de la substance étant faible, il faut donc attendre un nombre de jours plus ou moins grand pour permettre à la substance-mère de venir au contact du fer et de le redissoudre en donnant la coloration caractéristique (LASSEUR).

ROLE DU SULFATE DE MAGNÉSIE

Le sulfate de magnésie exalte le pouvoir chromogène de *B. mesentericus niger*. La coloration apparaît d'autant plus vite que la concentration du milieu est plus élevée.

Le passage sur les milieux sans magnésie n'affaiblit pas le pouvoir chromogène (W. PALGEN, 1925).

*
* *

Par l'étude des pigments produits par *B. mesentericus fuscus* et *B. mesentericus niger* on a un moyen sûr et rapide de diagnose de ces deux espèces.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

LES PIGMENTS BACTÉRIENS

PRÉLIMINAIRES

La Microbiologie générale ne fait pas de différence entre la sécrétion d'une diastase, la production d'un pigment ou la fabrication d'une toxine. C'est pour cette raison que la fonction chromogène des Bactéries a depuis longtemps attiré l'attention des Savants.

Les nombreux exemples de variation, de mutation encombrant la littérature bactériologique et qui ne sauraient être acceptés sans restriction ont eu bien souvent pour thème la chromogénèse bactérienne.

L'étude du pigment microbien présente en effet un double intérêt. Tout d'abord il consiste en une manifestation vitale bien reconnaissable. Puis il est susceptible, comme toutes les fonctions, de modifications très variées sous l'influence de nombreux facteurs. Pour déceler des modifications, concernant la chromogénèse, il n'est pas nécessaire d'avoir recours à des recherches difficiles : un simple examen suffit à lui seul pour constater un changement de coloration.

A l'heure actuelle on ne songe plus à nier la coloration des milieux de culture sous l'influence des Bactéries ; des études approfondies permettent de décrire chaque jour comme chromogènes, des microorganismes qui avaient été considérés jusqu'alors comme achromogènes. C'est ainsi que LASSEUR et THIRY (1913), à la suite de leurs expériences, ont montré que les germes du groupe de *B. mesentericus* étaient capables de produire diverses colorations dans des milieux synthétiques de composition chimique bien définie. Ayant constaté l'existence de ces diverses substances qui coloraient le substratum sur lequel se développent les germes chromogènes

les Savants ne sont cependant pas tout à fait d'accord en ce qui concerne leur définition et leur localisation.

SIÈGE DES PIGMENTS

En dehors des germes achromogènes qui peuvent prendre naissance à partir de souches normalement chromogènes, l'activité chromogène de la plastide bactérienne peut se manifester de différentes manières. Si des germes tels que *B. caryocyaneus*, *B. pyocyaneus*, *B. chlororaphis*, etc. . bien que produisant des couleurs intenses, montrent des éléments bactériens dénués de toute coloration, il en est d'autres qui présentent un pigment intracellulaire.

Tous les auteurs admettent que les Bactéries pourpres sont imprégnées de Bactériopurpurine.

LASSEUR (1924) a montré que *B. Le Monnieri* peut présenter des plastides très mobiles avec au centre un gros grain chromatique, coloré en bleu foncé, tandis que d'autres sont peu mobiles et peu colorées. Un examen plus approfondi permet de voir une structure granuleuse avec vacuoles et grains cytoplasmiques, colorés en bleu. Des faits analogues ont été observés chez *B. indigoferus* VOGES par THIRY (1893) et chez *B. polychromogenes* par CHAMOT et THIRY (1897).

LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et COMBE (1931) ont montré que *B. prodigiosus* constituait un terme intermédiaire entre les germes présentant des plastides normalement colorés et ceux en offrant de régulièrement incolores. Ces auteurs, en employant le microscope binoculaire de Zeiss, muni d'objectif de 1,5 à 2 m/m. et d'oculaires apochromatiques 12,5 X, ont constaté, dans les plastides de *B. prodigiosus*, la présence de grains rouge rubis ou rouge foncé, plus ou moins nombreux, le reste de l'élément paraissant complètement incolore.

Ces faits sont tout à fait en accord avec ce qui avait été observé par LASSEUR sur *B. Le Monnieri*.

Il découle de ces observations que *B. prodigiosus* a été considéré comme une forme intermédiaire entre les Bactéries, dont le pigment imprègne toute la plastide et celles colorant le substratum nutritif, mais dont toutes les plastides paraissent normalement incolores.

Dans un remarquable travail qui a été hautement apprécié dans le monde entier, A. DUPAIX (1933) a montré qu'avec l'emploi d'une combinaison optique apochromatique, la plus grande partie des plastides constituant de

vieilles cultures de *B. caryocyaneus* paraissait à peine colorée. L'auteur a cependant observé des éléments légèrement teintés en brun ou en vert, tandis que d'autres plastides montraient au contraire des grains colorés en brun ou en vert foncé. Examinés en masse sous une épaisseur de plusieurs centimètres les corps microbiens, soumis à des lavages répétés, étaient colorés en bleu foncé ou noir. Pour A. DUPAIX quels que soient sa nature et son siège le pigment doit nécessairement diffuser à un moment donné hors de l'élément bactérien, et cela, nécessairement à la suite de la peptisation de la plastide.

Dans la coloration des plastides, A. DUPAIX fait encore jouer un grand rôle à l'absorption. *B. caryocyaneus*, *B. cyaneo-fuscus* BEIJERINCK, *B. polychromogenes* CHAMOT et THIRY, *B. indigoferus* VOGES produisent en effet dans les cultures des masses de pigment amorphes de toutes dimensions et de toutes formes. A la suite de la solubilisation de ces amas de substance pigmentaire, une partie de la matière colorante peut être absorbée par la membrane de la cellule, qui paraît alors légèrement teintée.

IDENTIFICATION DES PIGMENTS MICROBIENS

On peut obtenir très facilement des cristaux purs de chlororaphine et des cristaux de pyocyanine. Il n'en est pas de même pour toutes les autres substances chromogènes. En effet, malgré les ébauches de formes cristallines qui sont fréquemment observées après l'évaporation des solvants utilisés, il est souvent impossible d'obtenir des cristaux. C'est ainsi que toutes les tentatives effectuées par A. DUPAIX pour obtenir la caryocyanine à l'état cristallisé ont été vaines. Les nombreuses techniques utilisées telles que l'analyse capillaire, l'emploi de sulfate d'ammoniaque, d'acétone n'ont donné aucun résultat. Ces procédés d'extraction avaient pourtant rendu de grands services dans d'autres circonstances à LASSEUR (1914) qui les avait préconisés.

Devant les grandes difficultés que présente l'obtention de corps cristallisés, les Microbiologistes ont eû recours aux spectres d'absorption pour la caractérisation des pigments. Malheureusement les résultats ne furent pas très appréciables; ils avaient, en effet, été obtenus à l'aide d'une échelle arbitraire sans concordance avec les longueurs d'onde.

LASSEUR et GIRARDET reprenant l'étude de quelques pigments en utilisant les longueurs d'onde d'une part et les méthodes d'HARTLEY et de FORMANEK d'autre part ont rendu de grands services à la Bactériologie.

Nous allons envisager successivement le rôle de l'analyse capillaire et de la spectrographie dans l'identification des pigments.

I. — ANALYSE CAPILLAIRE

L'analyse capillaire, connue aussi sous le nom de méthode de GOPPELS-RÆDER, permet dans une certaine mesure de contrôler le degré de pureté des corps colorés. Par elle, on peut se rendre compte si un pigment est pur ou s'il est le résultat de l'association de plusieurs autres substances colorantes; elle fournit en même temps de précieuses indications en ce qui concerne son extraction.

Si les impuretés accompagnant les substances colorantes ne paraissent pas jouer un grand rôle dans la partie du spectre s'étendant de $\lambda = 740$ à $\lambda = 420$, dans l'ultra violet au contraire, de nombreux corps incolores absorbent plus ou moins les radiations de longueur d'onde courte.

Comme l'a signalé LASSEUR en 1914, il peut y avoir beaucoup d'intérêt à substituer à la notion de hauteur d'ascension, celle de vitesse d'ascension capillaire. Ce savant a montré qu'en utilisant cette notion, les résultats obtenus dans l'étude du pigment vert d'*Aleurisma flavissimum* sont fort différents selon le solvant utilisé.

Si l'alcool ne permet pas de préciser le caractère complexe du pigment, par contre avec la benzine cristallisable, on sépare très facilement deux principes colorants: l'un jaune, l'autre bleu vert.

Le choix judicieux du solvant, aidé par la recherche des différences d'ascension capillaire, rend possible la séparation rapide des constituants d'un mélange de corps colorés (1).

Il faut en outre, dans l'analyse capillaire, prendre certaines précautions qui ont été soulignées par LASSEUR en 1914, et précisées par LASSEUR, A. DUPAIX et J.-G. MARCHAL (1933) telles que: choix judicieux du papier, emploi de solutions très diluées, suppression des actions capillaires entre les parois des vases et la substance poreuse, utilisation d'une atmosphère pure et aussi calme que possible, échantillonnage du papier, degré d'hygroscopicité du papier, etc... Parfois même il y a un très gros intérêt à travailler en atmosphère inerte, les pigments étant généralement sensibles à l'action de l'oxygène de l'air.

(1) LASSEUR a fait remarquer que la molécule peut subir des modifications au sein du solvant utilisé (ionisation, hydrolyse, etc.) se traduisant par des changements de coloration des solutions, qui peuvent entraîner des erreurs dans l'interprétation des résultats.

II. — SPECTRE D'ABSORPTION (1)

Dans leurs recherches, les Bactériologistes ont adopté une échelle arbitraire, ce qui prête à des confusions nombreuses. LASSEUR et GIRARDET ont montré qu'il est de toute nécessité d'utiliser la notation en longueur d'onde. En opérant ainsi, ils ont indiqué que l'absorption était fonction d'un assez grand nombre de facteurs : de l'épaisseur, de la concentration (lorsqu'ils faisaient varier cette dernière, le corps dissout se modifiait en s'ionisant), de la température, de l'âge des solutions colorantes.

Pour caractériser une substance susceptible d'être obtenue cristallisée pure, on peut se contenter d'établir les bandes d'absorption pour une concentration, une épaisseur, une température déterminées. En ce qui concerne les pigments microbiens pour la plupart tous difficilement cristallisables, la chose n'est pas aussi simple. LASSEUR et GIRARDET ont combiné la méthode de FORMANEK GRANDMOUGIN et celle de HARTLEY.

Méthode de FORMANEK GRANDMOUGIN. — Dans cette première méthode les auteurs opèrent sur des solutions suffisamment diluées. Ils déterminent la position du seul maximum d'absorption définissant la bande. De cette manière on distingue des bandes principales et des bandes secondaires. FORMANEK et GRANDMOUGIN ont montré de plus que sous l'action des bases ou des acides choisis de façon convenable, il est possible de déterminer des modifications de l'absorption.

Cette méthode peut rendre de grands services, car elle est indépendante de la concentration. Ceci est très avantageux pour l'étude des substances non cristallisables desquelles il est difficile d'obtenir une solution concentrée.

Méthode de HARTLEY. — HARTLEY au contraire, fait varier la concentration ou l'épaisseur de la couche absorbante. Il établit des courbes d'absorption qui sont tout à fait caractéristiques.

Une substance ne se détermine pas par les limites des bandes, mais bien par l'allure générale de la courbe d'absorption.

M. HARTLEY fils (1913) a su tirer un parti merveilleux de la technique de son père et l'appliquer avec le succès que l'on sait à l'étude du pigment de *B. violaceus*.

(1) Se reporter aux spectogrammes (planches à la fin du volume).

CAUSES D'ERREUR DANS LA DÉTERMINATION DES PIGMENTS

LASSEUR étudiant les pigments microbiens a montré qu'il existait de nombreuses causes d'erreur dans ce genre d'étude. Les pigments microbiens sont en effet des corps très instables particulièrement sensibles aux oxydants et aux réducteurs. Les solutions de certains d'entre eux sont détruites à la lumière, d'autres à l'obscurité; elles sont facilement altérées par la chaleur qui les décompose. La coloration peut varier considérablement suivant la réaction du milieu dans lequel elle se produit. La nature et le degré de pureté du solvant peuvent aussi la modifier sensiblement.

COMPOSITION DES PIGMENTS MICROBIENS

La constitution des pigments microbiens a suscité de nombreuses recherches.

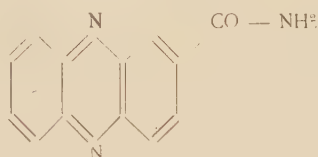
La prodigiosine étudiée successivement par GRIFFITH (1892), SCHEURLEN (1896), KRAFT (1902), LEHMANN (1914), LASSEUR (1926) s'est vu attribuer par F. WREDE et O. HETTCHÉ (1929) la formule définitive suivante: $C^{20}H^{25}N^3O$.

La pyocyanine après son isolement par GESSARD en 1882 a été étudiée par LEDDERHOSE (1888), MADINAVETTIA (1916), LASSEUR (1926), WREDE et STRACK (1929) en ont fait un Bis (méthyl 10 oxo 1 tétrahydro-1.9.9. 10 phénazyndiyl-9. 9) possédant le schéma suivant.



L'étude des pigments microbiens doit beaucoup au Savant allemand

KÖGL qui en 1930 reprit l'étude de l'oxychlororaphine. Grâce au geste désintéressé de M. le Professeur LASSEUR, qui a adressé à KÖGL une certaine quantité d'oxychlororaphine, ce Savant a pu en établir la formule brute ($C^{13}H^9N^5$) que l'on peut développer de la façon suivante :



Ces formules ont un très haut intérêt, car elles vérifient les idées émises par LASSEUR à ce sujet, à savoir : que le magnésium, le cuivre, le fer n'entrent pas dans la composition des pigments bactériens. Ces éléments dont la présence à l'état de traces est indispensable pour la fabrication des pigments, ont un rôle tout à fait spécial.

ACTION DE QUELQUES FACTEURS SUR LA CHROMOGÉNÈSE BACTÉRIENNE

De nombreux savants ont attaché leur nom à l'étude des conditions de production des pigments. Le pouvoir chromogène a été considéré pendant longtemps comme une propriété variable de la plastide bactérienne. Il pouvait être maximum, faible, ou nul. On n'avait pu préciser les facteurs agissant sur lui.

LASSEUR en étudiant le rôle de divers électrolytes à l'état de traces, de l'action de la nature et de la surface des parois sur la chromogénèse, est incontestablement l'auteur qui a le plus contribué à définir les conditions de production des pigments.

C'est à Nancy de même qu'ont été effectuées les premières recherches sur l'influence du fer sur la chromogénèse bactérienne.

Certaines Bactéries colorent le milieu nutritif en formant un sel de fer (c'est le cas des germes du groupe *subtilis*, *mesentericus*, *megatherium*). Ce cas est excessivement rare ; cet élément n'intervient pas d'ordinaire dans la constitution chimique du pigment. Le fer agit comme catalyseur et son rôle est bien connu en ce qui concerne les échanges respiratoires des tissus musculaires et les oxydations biologiques.

Dans d'autres cas, comme celui de certains germes tels que *B. pyocyaneus*, *B. cyaneo fluorescens* ZANGEMEISTER, le fer n'agit que pour augmenter, dans des proportions considérables, la production du pigment qui, sans lui, n'aurait existé qu'à l'état de traces.

Enfin chez d'autres Bactéries, telles que *B. chlororaphis*, *B. Le Monnieri*, *B. caryocyaneus*, *B. prodigiosus*, le fer est indispensable à la production des pigments, mais des quantités extrêmement faibles suffisent à la chromogénèse.

Ces notions préliminaires étant soulignées nous allons étudier maintenant quelques-uns des facteurs, agissant sur la chromogénèse bactérienne.

INFLUENCE DE QUELQUES AGENTS PHYSIQUES

I. — ACTION DE LA TEMPÉRATURE SUR LES BACTÉRIES CHROMOGÈNES

La température de culture des Bactéries n'est pas sans influence sur la chromogénèse bactérienne. Les expériences de SCHOTTELLUS (1887), WASERZUG (1888), DELANOE (1906) ont montré qu'il était possible d'obtenir des cultures achromogènes de *B. prodigiosus* en soumettant les plastides de cette espèce à des températures de 37°-39° C. durant quinze à vingt passages.

Etudiant *B. Le Monnieri*, LASSEUR et VERNIER (1923) ont montré que l'optimum pour la production du chromogène bleu, sécrété par ce germe, était aux environs de 20°-22° C. Au-dessus de 30° C., en même temps qu'on note un ralentissement de la végétation, il est facile de constater une réduction et même un arrêt de la production de la matière colorante.

Le maintien à la température optimum de développement de la pigmentation, conduit rapidement à une atténuation et même parfois à une perte totale de la fonction chromogène. On note en même temps une diminution de la vitalité des Bactéries. Faisant pousser *B. caryocyaneus* à la température de 39° à 40° C., A. DUPAIX (1933) a obtenu, par passages successifs et sélection des tubes de culture, des souches se développant bien à ces températures; mais elles ne sécrétaient plus aucun pigment. La perte du pouvoir chromogène coïncide bien avec une diminution de la vitalité de la Bactérie, car après une cinquantaine de passages à 40° C. la souche ne se développe plus.

II. — ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LES BACTÉRIES CHROMOGÈNES

De nombreuses recherches ont signalé l'influence de la lumière sur les pigments sécrétés par les Bactéries. GAILLARD (1888) a montré que la lumière était préjudiciable à la sécrétion du pigment de *Staphylococcus pyogenes aureus*, *B. prodigiosus*, etc.... LAURENT (1890) a signalé de même que les radiations solaires ont une action néfaste sur la matière rouge, sécrétée par le Bacille rouge de KIEL. Il a même montré qu'à partir d'un germe de cette espèce soumis à l'insolation durant un certain temps, il était possible d'obtenir une modification blanche des plus stables dans la descendance.

Séparant les radiations calorifiques des radiations chimiques, les premières à l'aide d'une solution d'alun, les secondes avec une solution de sulfate de quinine, LAURENT a comparé l'action de chacune d'elles avec la lumière directe. Il a souligné de ce fait l'influence prépondérante des rayons lumineux du spectre sur le Bacille rouge. Il lui a paru d'autre part que toutes les radiations lumineuses intervenaient dans la destruction du pigment et la production de races incolores chez le Bacille rouge de KIEL. Le maximum d'action était obtenu dans la partie la plus réfrangible de ces radiations.

Etudiant l'influence de la lumière solaire sur le Bacille du pus bleu, d'ARSONVAL et CHARRIN (1894) ont vu qu'une exposition de 3 à 6 heures d'une culture de ce germe était susceptible de produire des colonies incolores après réensemencement du germe insolé sur des plaques de gélose.

Faisant de nouvelles recherches sur l'influence de la lumière solaire et des lumières colorées sur la production du pigment vert fluorescent dans les cultures du Bacille pyocyanique, LESIEUR et LEGRAND (1905) sont arrivés aux conclusions suivantes :

La lumière directe du soleil empêche dans une certaine mesure *B. pyocyaneus* de produire son pigment vert fluorescent. Les diverses radiations de la lumière ont une action très différente.

La lumière solaire est susceptible de produire chez *B. pyocyaneus* des modifications de la fonction pigmentaire transmissible par hérédité, quoique tendant à s'atténuer au cours des générations successives.

INFLUENCE DU MILIEU

On sait que le pouvoir chromogène d'une Bactérie est fonction du substratum nutritif sur lequel elle se développe.

Pour mettre en évidence la propriété chromogène d'un germe il est de

toute nécessité d'utiliser un milieu de composition déterminée. Les terrains liquides et solides qui servent d'ordinaire à la culture des Bactéries tels que : eau peptonée, gélose peptone, etc.... sont constitués par des substances peu définies. Il faut donc employer des milieux synthétiques ; nous signalerons à ce sujet les belles recherches effectuées par LASSEUR et ses Collaborateurs qui ont adopté pour effectuer ce genre d'études les milieux décrits dans les manuels sous les noms de milieux L1 et L2 (ce sont les abréviations par lesquelles sont désignés le milieu synthétique I et le milieu synthétique II de LASSEUR). Pour réaliser un milieu synthétique de composition déterminée un point retiendra particulièrement notre attention : on doit avant tout s'assurer du degré suffisant de pureté des substances que livre le commerce, sinon il faut procéder à leur purification. En effet, si certains éléments sont absolument indispensables à l'état de traces pour assurer la chromogénèse, la présence d'autres substances, même à des doses infinitésimales, peut gêner ou empêcher la chromogénèse.

LASSEUR dans une étude sur le pouvoir chromogène (1913) (1) a attiré plus particulièrement l'attention sur l'eau utilisée dans la préparation des milieux synthétiques. A l'aide de mesures de conductibilité électrique il s'est assuré que cette eau renfermait le moins possible d'impuretés mesurables : LASSEUR considère comme bonne, une eau pour laquelle la conductibilité spécifique correspond à $K \leq 1,10$ à 25° C.

Ce résultat s'obtient facilement en soumettant l'eau distillée ordinaire à une distillation dans des appareils en cuivre et étain décrits par BOURDIL-LON (1913) modifiés par GIRARDET.

La purification des substances utilisées étant réalisée il faut encore éviter l'apport de substances étrangères par l'intermédiaire des vases servant aux cultures. A la température ordinaire l'eau distillée attaque certains verres avec une assez grande facilité. FRESENIUS (1879) avait déjà signalé que l'eau distillée attaque le verre de Bohême à la température de 100° C. Cette attaque du verre par l'eau a été étudiée d'une façon systématique par LASSEUR et ses Collaborateurs.

Les vases en verre très résistant ayant contenu de l'eau distillée depuis longtemps doivent être préférés à des récipients neufs. On peut cependant vieillir artificiellement des vases en les soumettant à l'action d'un courant prolongé de vapeur d'eau ou en les portant plusieurs fois à l'autoclave à 120° C. après les avoir remplis au préalable d'eau distillée.

(1) In Recueil publié à l'occasion du jubilé scientifique du Professeur G. LE MONNIER, Berger-Levrault, 1913, pp. 99-111.

INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DE LA COUCHE LIQUIDE

LASSEUR a montré que la coloration des cultures obtenues avec les germes chromogènes pouvait être fonction, dans certains cas, de l'épaisseur de la couche liquide ensemencée. C'est ainsi qu'il a observé que *B. chlororaphis*, *B. Le Monnieri* montraient des aspects cultureux variables en relation avec l'épaisseur de la couche du liquide utilisé.

Il a comparé les résultats obtenus en ensemençant en même temps des tubes à essai et des ballons contenant du milieu synthétique. Puis, pour éviter des causes d'erreur dues à la nature des parois, l'auteur a utilisé des vases sur lesquels étaient soudés des tubulures latérales de diamètre décroissant.

INFLUENCE DU pH DES MILIEUX DE CULTURE SUR LE POUVOIR CHROMOGÈNE

Il y a vingt-cinq ans environ on préconisait des milieux à réaction acide pour cultiver les Champignons et les milieux à réaction neutre ou alcaline pour le développement des Bactéries.

Bien des irrégularités de croissance constatées avaient démontré déjà la nécessité de préciser davantage la notion d'acidité ou d'alcalinité des milieux nutritifs.

Dès 1905, les Américains s'étaient efforcés de standardiser la réaction des milieux de culture.

En France le tournesol et la phénol-phtaléine étaient utilisés comme indicateurs dans la neutralisation des substratums nutritifs et les efforts de GRIMBERT (1898-1903) étaient restés vains.

Les travaux de V. HENRI (1906) soulignant le rôle des ions H^+ en Biologie avaient été dédaignés par ses contemporains. Il fallut attendre l'arrivée de SORENSEN et la publication du célèbre travail de CLARCK (1923) pour voir entrer dans la pratique courante, les nouvelles méthodes consacrées à la recherche de la concentration en ions H^+ du milieu.

ABT (1923) a vulgarisé les méthodes colorimétriques permettant la détermination de la concentration en ions H^+ . Il signalait les nombreux indicateurs permettant de déterminer d'une façon approximative l'ordre de grandeur du pH et montrait toute l'importance qu'il y avait à mesurer d'une manière précise la réaction des milieux de culture.

Depuis cette époque de très nombreux mémoires ont été consacrés à l'ap-

plication du pH en Microbiologie. Les méthodes électrométriques ont pris le pas sur la détermination colorimétrique du pH. Mais la méthode électrométrique quoique plus précise comporte néanmoins de nombreuses causes d'erreur.

LASSEUR, M. OLIVIER, A. DUPAIX (1930), LASSEUR, FRIBOURG et GROJEAN (1923), DUPAIX (1933), ont étudié la relation existant entre le pH du milieu nutritif et le pouvoir chromogène de *B. caryocyanus*. Ils ont montré que si l'on observait un maximum de fluorescence à $\text{pH} = 7,2$, il était dû à une concentration en ions H^+ plus favorable à la multiplication bactérienne. La production du pigment bleu violet et du pigment bleu par contre s'observe surtout dans des zones de concentration variant de $\text{pH} = 5,4$ à $\text{pH} = 7$. Mais c'est dans des milieux de $\text{pH} = 6$ que le pigment violet apparaît le premier.

Il ne faut pas oublier cependant qu'au cours de son développement la Bactérie modifie d'une façon considérable le milieu où elle vit. L'hydrolyse de l'asparagine avec formation d'ammoniaque par les Bactéries fluorescentes est un fait tout à fait banal.

Les Bactéries aérobies se développent en surface ; donc dans les premières heures de culture une zone de quelques millimètres de hauteur est le siège de modifications profondes. Or la diffusion des produits microbiens n'est pas instantanée. Il en résulte que la zone de végétation active peut être à un pH très différent de celui du reste du liquide. C'est ce qui explique pourquoi les mesures de pH effectuées sur une partie aliquote de culture, prélevée sans précautions spéciales peuvent conduire à des conclusions erronées. Ainsi, lorsqu'on note une fluorescence verte dans un milieu de pH initial = 4,63 la zone de liquide où la fluorescence est apparue n'est pas à $\text{pH} = 4,63$, elle peut être par exemple comprise entre $\text{pH} = 6,8$ et $\text{pH} = 7,2$.

INFLUENCE DE QUELQUES ÉLÉMENTS ENTRANT DANS LA COMPOSITION DU MILIEU SYNTHÉTIQUE

1° FER

RAULIN (1870) a montré l'influence du fer dans le développement de *Aspergillus niger*. Le mécanisme de cette action a été étudié ultérieurement par LIXOSSIER (1880-90-91) et SAUTON (1910). S'inspirant des tra-

vaux de ces savants Ph. LASSEUR (1911-1912-1913); LASSEUR et G. THIRY (1913), LASSEUR et PALGEN (1925), F. NEPVEUX (1920), LASSEUR et VERNIER (1924), LASSEUR, THIRY et A. DUPAIX (1930), LASSEUR, DUPAIX et COMBE (1931), LASSEUR, MARCHAL, A. DUPAIX et M. RENAUX (1932), A. DUPAIX (1933), se sont efforcés de préciser le rôle du fer dans la production des pigments bactériens.

L'irrégularité de la production de la chlororaphine avait conduit LASSEUR à rechercher si des traces d'un élément banal ne pourraient influencer sur la production des corps colorés sécrétés par *B. chlororaphis*.

L'expérience démontre que :

- 1° les milieux pourvus de fer donnent une production régulière de chlororaphine, à la condition que la dose apportée soit de l'ordre de 1 milligramme;
- 2° des quantités de l'ordre de 0 mmgr. 5 ne permettent qu'une production irrégulière de chlororaphine;
- 3° dans les milieux rigoureusement dépourvus de fer il n'y a pas production de chlororaphine;
- 4° l'apport aseptique de fer, en quantité convenable, dans les cultures dépourvues de cet élément, donc incolores, permet la production de cristaux verts.

L'action du fer est donc spécifique et les faits observés avec *B. chlororaphis* se retrouvent avec *B. Le Monnieri*, *B. caryocyaneus*, *B. prodigiosus*, avec différentes souches de *B. cyaneo-fluorescens* et le Bacille étudié par NEPVEUX.

En ce qui concerne *B. caryocyaneus*, A. DUPAIX (1933) a montré d'une façon irréfutable le rôle du fer dans la production du pigment bleu violet et violet rouge et dans le noircissement ultérieur des cultures. Cet auteur a signalé que dans des cultures de *B. caryocyaneus*, effectuées en milieu sans fer, on n'observe pas la formation de la coloration bleu violet ou violet rouge caractéristique du germe. Par contre si dans de telles cultures d'âge convenable, on effectue des apports aseptiques de sulfate ferreux, on constate l'apparition des colorations caractéristiques du germe (bleu violet, violet rouge, puis noircissement du voile).

MARCHAL a étudié de même (1932) différentes variétés de *B. pyocyaneus*. Il a signalé que cette espèce pouvait produire de très faibles quantités de pyocyanine dans des milieux synthétiques dépourvus de fer. Un apport ultérieur de cet élément, en proportion convenable, dans des cultures

de 48 heures était susceptible de faire apparaître très rapidement une abondante production de pyocyanine. Le sulfate de fer ainsi additionné détermine en même temps un sursaut très net de la végétation.

Avec les germes du groupe *mesentericus* sécrétant un pigment noir, la quantité de fer apportée doit être plus grande pour permettre l'obtention de cultures très colorées.

Mécanisme de l'action du fer:

Le rôle du fer dans la chromogénèse est difficile à préciser. LINossier (1889-90-91) a pensé qu'il entrerait dans la composition des spores de l'*Aspergillus niger*. En ce qui concerne la prodigiosine, dans la composition de laquelle la présence de cet élément ne peut être constatée (WREDE et HETTCHE 1922), il est impossible d'admettre une telle hypothèse.

LASSEUR dès 1911 attribuait au fer un rôle multiple:

1° Le fer entre dans la composition des corps colorés sécrétés par les Bacilles du groupe *subtilis-mesentericus*.

2° Le fer agit comme porteur d'oxygène; ce rôle est général. Il s'observe pour toutes les Bactéries étudiées. Le fer ne permet la production de corps colorés que si la culture est effectuée en milieu aéré (phénomène d'oxydo-réduction).

3° Le fer stimule la production de la substance-mère de nombreux pigments et pour atteindre ce but des quantités très faibles de fer suffisent.

Ainsi d'après A. DUPAIX l'ordre de grandeur des conceptions actives ferait rapprocher le rôle de cet élément des actions catalytiques. Ce serait ainsi la seule hypothèse susceptible d'une généralisation.

2° MAGNÉSIUM

GESSARD (1892) n'a pas cru trouver dans le magnésium un élément exerçant une action considérable sur l'aspect des cultures de *B. pyocyaneus*.

KUNTZ (1900), SAMKOW (1903), signalent l'influence du sulfate de magnésium sur la fonction chromogène de *B. prodigiosus*. SULLIVAN (1905) démontre que la présence de sulfate de magnésie est nécessaire non seulement à la formation des pigments rouges (*B. prodigiosus*, *B. rosaceus metalloïdes*, *B. ruber balticus* mais aussi à celle des pigments violets (*B. violaceus*, *B. janthinus*),

En 1911 Ph. LASSEUR obtient une production abondante de chlororaphine en milieu synthétique LI ; mais dans un milieu où l'on supprime le sulfate de magnésie, *B. chlororaphis* donne des cultures toujours incolores, ne présentant jamais de cristaux.

LASSEUR, THIRY, A. DUPAIX, OLIVIER (1930), A. DUPAIX (1933), montrent qu'en l'absence de magnésium *B. caryocyaneus* donne des cultures incolores en milieu LI de LASSEUR : « *En l'absence de sulfate de magnésium, la fonction fluorescigène ne peut se manifester.* »

Il y a plus ! Il faut que le milieu renferme des quantités relativement élevées de sulfate de magnésium pour montrer de belles colorations.

En général pour des doses de 1 à 2 milligrammes de chlorure de magnésium, les cultures ne présentent qu'une coloration jaune.

Si à de telles cultures on ajoute du sulfate de magnésium dans la proportion de 80 milligrammes pour cent, on observe l'apparition instantanée ou très rapide (suivant le mode d'apport de l'électrolyte) d'une magnifique fluorescence vert intense.

C'est une des expériences les plus belles et les plus démonstratives que l'on puisse réaliser en Microbiologie.

MARCHAL (1932) a montré qu'en l'absence du magnésium il n'était pas possible d'obtenir de manifestation chromogène dans des cultures de *B. pyocyaneus*.

Pour A. DUPAIX (1933) la fonction fluorescigène de *B. caryocyaneus* ne peut se produire en l'absence de sulfate de magnésium. Un apport tardif de cet élément, en proportion convenable, dans des cultures âgées de huit jours et complètement incolores, détermine après 24 heures l'apparition d'une superbe fluorescence. Des expériences substituant le chlorure au sulfate ont démontré que le sulfate de magnésie agirait par son cation et non par son anion.

Si le rôle du magnésium dans la fluorescence est définitivement établi il est cependant encore impossible à l'heure actuelle de préciser le mécanisme de son action.

3° PHOSPHORE

D'une part NICOLLE et ZIA BEY (1896) ont signalé que *B. pyocyaneus* pouvait se développer et produire son pigment en l'absence de phosphore, d'autre part GESSARD a mis en lumière l'extraordinaire sensibilité de *B. pyocyaneus* aux phosphates.

Les recherches poursuivies depuis cette époque soulignent que la plupart des germes chromogènes exigent la présence de sels de phosphore pour pouvoir se développer.

En ce qui concerne les manifestations chromogènes, une certaine quantité de phosphate de potasse est nécessaire pour qu'elles puissent se manifester. C'est ainsi que LASSEUR (1911) a souligné l'importance de la quantité de phosphate de potasse nécessaire à *B. chlororaphis* pour produire des cristaux verts dans le milieu où il se développe. MARCHAL (1932) a montré de même que dans l'espèce pyocyanique, la chromogénèse exigeait des doses variables de phosphate dipotassique pour pouvoir se manifester.

A. DUPAIX étudiant *B. caryocyanus* (1933) a fait des observations analogues.

4° CALCIUM

LASSEUR (1911) a trouvé dans le chlorure de calcium un élément semblant favoriser d'une façon appréciable la production de chlororaphine. Les cristaux pouvaient se produire néanmoins en l'absence de ce sel mais en quantité bien moindre. On connaît la difficulté de préparer un milieu rigoureusement privé de calcium. Il est cependant possible d'arriver, en s'entourant d'extrêmes précautions, à obtenir un milieu ne contenant pas cet élément.

Tous les germes ne se comportent cependant pas rigoureusement de la même façon : c'est un fait qu'il ne faut pas oublier de signaler. De plus, l'ion Ca, plutôt toxique, peut avoir un retentissement variable sur les plasmides et partant, sur les fonctions chromogènes des différentes espèces bactériennes.

ALIMENTS AZOTÉS ET CARBONÉS

En dehors des éléments minéraux nécessaires pour assurer certaines de leurs fonctions, les Bactéries ont encore besoin de rencontrer, dans les milieux où elles se développent, une source d'azote et une source de carbone.

C'est ce que nous allons envisager très brièvement.

1° ALIMENTS AZOTÉS

L'étude du milieu synthétique type, utilisé par LASSEUR (1911), dans l'étude de *B. chlororaphis*, lui a permis de montrer que l'asparagine cons-

tituant la source d'azote pouvait être remplacée par le glycolle, l'urée, l'acide aspartique, et le succinate d'ammoniaque. Il est nécessaire toutefois de modifier un peu le mode de préparation du milieu. Par exemple la stérilisation par la chaleur amène toujours une hydrolyse de l'urée en formant une certaine quantité de carbonate d'ammoniaque. En ce qui concerne *B. chlororaphis*, le carbonate d'ammoniaque doit être neutralisé après stérilisation car ce germe est très sensible à l'ammoniaque.

Le succinate d'ammoniaque n'est pas indispensable à la formation du pigment sécrété par *B. Le Monnieri*. Le rendement en matière colorante, est fonction de la quantité de sel contenu dans le milieu. Ceci tient à ce que la production de pigment croît avec l'intensité de la végétation. Dans le cas de *B. chlororaphis* la suppression de l'aliment azoté empêche tout développement bactérien. De même, des quantités d'asparagine inférieures à 0 gr. 7 (LASSEUR, 1911) diminuent notablement la production des cristaux aussi bien que le développement de la Bactérie.

2° ALIMENTS HYDROCARBONÉS

Dans le milieu synthétique LI l'aliment hydrocarboné est représenté par la glycérine. En 1911 LASSEUR a montré que celle-ci pouvait être remplacée par d'autres aliments hydrocarbonés tels que : glucose, levulose et maltose.

B. chlororaphis ne produit des cristaux que lorsque le milieu sur lequel il est ensemencé renferme des produits alcooliques ou glucidiques susceptibles de fermenter de façon énergique. Lorsque le sucre est peu attaqué il y a production de substance-mère, mais la précipitation des cristaux est faible.

La glycérine influe notablement sur la végétation de *B. caryocyaneus* (A. DUPAIX, 1933). En l'absence de glycérine, ce germe donne à la surface des milieux synthétiques, une fine pellicule. On note en même temps la production d'une belle fluorescence verte dans le liquide nutritif. Cette coloration verte persiste durant deux semaines pour s'atténuer et disparaître ; mais à aucun moment du développement de la culture on n'observe le pigment bleu violet caractéristique de *B. caryocyaneus*.

La glycérine est donc indispensable à la production de la caryocyanine et à la végétation de *B. caryocyaneus* (A. DUPAIX, 1933). Ce fait avait déjà été souligné par GESSARD dans l'étude des germes pyocyaniques.

INFLUENCE DE LA SEMENCE DANS LA PRODUCTION DU PIGMENT

Dans l'étude de toutes les causes pouvant influencer la production des pigments, le rôle du germe lui-même ne doit pas être oublié.

La Bactérie vit en effet dans un milieu qu'elle transforme incessamment. Par suite de l'évolution d'une culture, le substratum nutritif est altéré et a perdu une partie de ses propriétés. Les transformations qu'il a subies peuvent avoir un retentissement profond sur le métabolisme bactérien. Ceci peut modifier considérablement la fonction chromogène.

Les Bactéries nées dans ce milieu modifié peuvent donc voir s'atténuer certaines de leurs propriétés. De même dans une culture âgée il existe une série de biotypes d'aptitudes très différentes qui, s'ils étaient isolés montreraient des propriétés individuelles propres.

Lorsqu'on repique sur un milieu déterminé des cultures âgées provenant d'une même race microbienne on observe fréquemment des différences d'intensité parfois considérables dans la coloration du substratum nutritif.

Des semences différentes peuvent donner avec un même milieu des cultures présentant des caractères variables. PASTEUR (1876), FITZ (1876-82), PERDRIX (1891), GRIMBERT (1893), LASSEUR et ses Collaborateurs (1911), MARCHAL (1932) ont tiré de leurs recherches des conclusions analogues.

Si l'âge d'une culture influe considérablement sur la fonction chromogène, DUCLAUX (1898), GRIMBERT (1893), LASSEUR (1911) ont souligné le rôle de l'éducation de la semence. Aussi comme LASSEUR le faisait remarquer en étudiant *B. Le Monnieri* (1913): « doit-on utiliser dans la pratique de l'étude des Bactéries chromogènes la méthode des cultures homogènes. Dans celles-ci toutes les cellules possèdent la faculté de produire des corps colorés dans un milieu donné. Bien que ces cultures ne conservent pas indéfiniment leur homogénéité, elles présentent ce caractère durant un laps de temps suffisant pour permettre des expériences précises.

De plus par passages successifs sur milieux solides (gélose, gélose asparagine, gélatine, gélatine glucosée, suivant les espèces) et milieux synthétiques (en sélectionnant naturellement les colonies les plus colorées), il est non seulement possible d'obtenir des cultures homogènes, mais encore d'isoler des colonies qui,ensemencées dans des conditions convenables, don-

nent une quantité de produits colorés de beaucoup supérieure à celle du type moyen (Bactéries expérimentées: *B. chlororaphis* GUIGNARD, *B. pyocyaneus* GESSARD, *B. coerules* VOGES, *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER, *B. syncyaneus* EHRENBERG, *B. Le Monnieri* LASSEUR et différents types du groupe *mesentericus*, *subtilis* et *megatherium*).

Notons que la sélection des colonies, orientée vers une production toujours croissante de matière colorée, montre d'abord une augmentation progressive du pouvoir chromogène jusqu'à un certain maximum. A partir de ce moment la production de corps colorés demeure constante pendant un certain temps. Ensuite, malgré la sélection, le pouvoir chromogène diminue peu à peu et revient au type moyen.

KRAFT (1902) a observé des phénomènes analogues avec *B. prodigiosus* » (LASSEUR, 1913).

ROLE DES PIGMENTS BACTÉRIENS. (1)

L'étude du rôle des pigments bactériens a soulevé de nombreuses discussions qui n'ont pas encore jusqu'ici amené de conclusions tangibles.

ENGELMANN (1883-88) pensait que les Bactéries pourpres étaient capables de décomposer CO^2 en présence de radiations lumineuses avec mise en liberté d'oxygène.

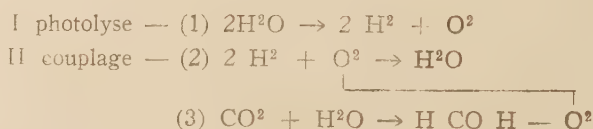
Ces faits confirmés par DANGEARD ont été contestés par MOLISH et WINOGRADSKY (1890).

Bien des savants ont jugé avec BUDER (1919) qu'il faut admettre l'existence d'une photosynthèse (ENGELMANN) et d'une chimiosynthèse (WINOGRADSKY).

On retrouve une théorie analogue dans l'assimilation chlorophyllienne. « BLACHMANN (1920) a montré en effet que l'assimilation chlorophyllienne est la résultante de plusieurs réactions, les unes photochimiques de vitesse V_1 , les autres non photochimiques de vitesse V_2 . V_1 dépend de la puissance du rayonnement incident, du pouvoir absorbant de la chlorophylle, de la fréquence du rayonnement et un peu de la température; par contre, V_2 est tout d'abord sous la dépendance de la température, puis de la teneur en CO^2 du milieu extérieur et de l'état du protoplasme incolore. Dans

(1) Pour rédiger cette partie du travail nous avons fait de larges emprunts à: Observations sur le pouvoir chromogène des Bactéries, par A. DUPAIX, *Bull. Assoc. des Dipl. de Microb.*, n° 2, 1931.

cette théorie le protoplasme joue un rôle secondaire. » (A. DUPAIX, 1931). Les Bactéries pourpres peuvent réduire CO^2 (photosynthèse) avec mise en liberté d'oxygène qui leur permet d'oxyder H^2S (chimiosynthèse). Pour WURMSER (1930), l'assimilation chlorophyllienne peut être représentée comme suit :



Dans sa théorie WURMSER a eu le mérite d'attribuer un rôle important au protoplasme. Du fait de sa nature, la cellule peut séparer à un certain stade les produits formés et permettre ainsi des réactions qui seraient impossibles sans cette particularité.

Que l'on envisage la réaction primaire comme une photoauto-oxydation avec WURMSER (1930) ou une photoréduction avec OSWALD, l'une comme l'autre de ces deux théories sont fondées sur les possibilités de localisation qu'offrent les cellules aux constituants des réactions. VAN NIEL à qui nous devons de très remarquables travaux de Microbiologie générale a trouvé que « 80 molécules de CO^2 doivent être réduites photosynthétiquement, afin de fournir l'oxygène nécessaire pour la réduction chimiosynthétique d'une seule molécule de CO^2 . Quantitativement la chimiosynthèse n'apparaît pas nécessaire. »

D'après VAN NIEL « dans l'hypothèse d'une photo et d'une chimiosynthèse séparées, il n'y aurait pas de relation quantitative entre H^2SO^4 , O^2 et « CO^2 réduit ». Si H^2S est considéré comme donneur d'hydrogène on observe une relation définie entre les produits de réaction: CO^2 réduit, S et H^2SO^4 et ainsi se trouve expliqué le fait que les Bactéries pourpres ne peuvent vivre en l'absence de H^2S . » (A. DUPAIX, 1933). On ne connaît rien de bien précis sur le rôle biologique de la bactériopurpurine et encore bien moins sur les autres pigments. La vie des Bactéries n'est pas obligatoirement liée à la production des corps colorés, « la fonction chromogène chez les Bactéries n'est pas une fonction nécessaire » (G. BOHN, 1901).

On éprouve de grandes difficultés à maintenir des races rigoureusement achromogènes. D'après les faits observés au Laboratoire de Microbiologie, le plus souvent, des cultures dites incolores renferment encore une très

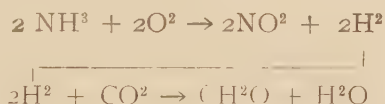
faible quantité de corps colorés et la suppression de toute trace de pigment est extrêmement difficile.

Le rôle du pigment paraît limité, dans le cas de sa production en très faible quantité, à moins qu'il ne représente le terme final d'une série de réactions chimiques.

Le pigment relativement stable semble dériver d'une substance incolore essentiellement instable (xanthoraphine, substance-mère de la caryocyanine ou de la prodigiosine, etc...). « *Par leur instabilité ces substances se prêtent à des phénomènes d'oxydation et de réduction et de ce fait peuvent jouer un rôle dans le métabolisme bactérien.* » (A. DUPAIX, 1931).

Le corps coloré peut être assez instable; c'est le cas de la pyocyanine. On sait déjà depuis très longtemps que des cultures de *B. pyocyaneus* d'âge convenable (en solution peptonée) présentent tout au plus en surface un fin liseré bleu ou verdâtre; par agitation, ou addition d'eau oxygénée, la masse se colore en bleu ou en vert plus ou moins foncé. Ce phénomène a été expliqué par WREDE (1930) qui a montré qu'une molécule de pyocyanine peut fixer quatre atomes d'hydrogène. Du fait de sa réduction et de sa réoxydation facile, la pyocyanine peut se comporter comme un « *accepteur* » d'hydrogène.

La chlororaphine dérive par réduction d'une substance jaune: la xanthoraphine (LASSEUR, 1911). Se basant sur les idées de LÆW (1891) qui explique la réduction du gaz carbonique par oxydation de l'ammoniaque par un couplage entre deux réactions:



LASSEUR a cherché s'il s'était manifesté, simultanément ou successivement une oxydation et une réduction lors de la production de la chlororaphine. Ainsi se trouvait esquissé le rôle des oxydo-réductions dans la production des pigments bactériens. Les faits acquis ultérieurement dans ce domaine, et notamment les recherches d'ELEMA (1933) ont justifié les vues de notre Maître.

WURMSER affirme que « *les synthèses sont généralement des réductions* ». S'il en est ainsi, il faut admettre que leur compensation énergétique est assurée au moyen des réactions d'oxydo-réduction (WURMSER, 1930).

Les Bactéries pourpres oxydent le soufre et réduisent le gaz carbonique.

Les Bactéries nitrifiantes oxydent l'ammoniaque en acide nitreux et réduisent le gaz carbonique.

FRIEDHEIM (1931) a montré que le pigment bleu du Bacille pyocyannique a pour fonction de catalyser la respiration du Bacille et que cette action catalysante du pigment ne se manifeste que sur des Bacilles privés de toute substance nutritive exogène.

Après ces essais il a paru intéressant à ce savant de rechercher si la fonction respiratoire dont est douée la pyocyanine est un phénomène isolé et si d'autres pigments bactériens auxquels on fait jouer un grand rôle dans la classification, possèdent eux-mêmes une fonction physiologique. C'est ainsi que FRIEDHEIM a étudié la violacéine.

Les résultats obtenus par cet auteur prouvent que *B. violaceus* sécrète un pigment se comportant comme la pyocyanine, quant à ses fonctions physiologiques. Il accélère l'oxydation des substances liées aux corps bacillaires et ne paraît jouer un rôle que lorsque les microorganismes sont obligés de vivre sur leurs propres substances, lesquelles, d'après ce savant seraient des lipides dont le pigment, du fait de son affinité particulière pour ces corps, accélère l'oxydation.

CHAPITRE III

ÉTUDES DE QUELQUES PIGMENTS BACTÉRIENS ⁽¹⁾

I. — PIGMENT SÉCRÉTÉ PAR LE BACILLE POLYCHROME

Dans un remarquable travail THIRY (1900) a étudié une Bactérie connue sous le nom de Bacille polychrome sur laquelle nous allons nous arrêter, car elle présente un très haut intérêt pour la Biologie générale, montrant combien un agent chromogène peut être susceptible de variation dans son activité.

B. polychromogenes donne, sur pomme de terre, des résultats très variables. Ainsi, sur un même tube de pomme de terre, lorsque l'ensemencement a été effectué de façon à isoler les colonies, G. THIRY a observé des colonies « violettes, violet noir, indigo bleu, vertes, orange, jaune citron, jaune or, jaune vert, ocre rouille, roses, rouges, grises, bistre, marron, cha-mois, etc... Ces colonies s'entourent ou non d'une auréole colorée en bleu, bleu indigo, vert, violet, rouge ou rosé. »

Sur gélatine peptone ce Bacille polychrome donne un pigment vert émeraude. Sur gélatine bouillon le pigment qui diffuse dans la masse est rouge vif.

Dans une culture de Bacille polychrome on peut observer des éléments colorés en rouge ou en bleu dont la coloration est localisée ou diffuse ; le plus généralement le Bacille est incolore. Chez les germes colorés le corps bacillaire peut être uniformément et totalement coloré ou présenter deux grosses granulations bleu indigo foncé.

Un Bacille divisé par un étranglement peut montrer une moitié colorée

(1) Au cours de ce chapitre seront relatées les expériences de Ph. LASSEUR et F. GIRARDET pour caractériser les pigments par leur spectre d'absorption. Nous prions le lecteur de se reporter aux spectrogrammes que nous avons reproduits à la fin de ce volume et que nous avons extraits des publications de ces deux auteurs.

en bleu, l'autre moitié colorée en rouge ou bien une colorée et l'autre incolore.

Conditions de production du pigment

La lumière ne paraît pas nécessaire à la coloration des cultures. Par contre, l'accès de l'air est indispensable. La pigmentation exigeant un optimum de température compris entre 10° et 20° C. peut encore se manifester à des températures plus basses, mais ne se produit pas à 37° C.

Solubilité du pigment

Le pigment est très soluble à froid dans l'eau distillée, l'eau chloroformée, camphrée, thymolisée.

Soluble dans l'alcool dilué et concentré, en gardant sa teinte primitive si l'alcool n'est pas acide, il est insoluble dans l'alcool absolu.

Le pigment est insoluble dans les alcools méthylique et amylique, dans l'éther, l'alcool éther, l'acétone, le chloroforme, le xylol, le benzol, l'éther de pétrole, la vaseline liquide, les huiles et les essences, la glycérine et le sulfure de carbone.

L'eau qui en est le meilleur solvant, donne des solutions de stabilité variable. Les solutions aqueuses, neutres ou alcalines conservées dans des tubes à essai ouverts ou des flacons bouchés pâlisent et se décolorent rapidement. La décoloration débute toujours par le fond du récipient pour gagner graduellement la surface qui au contact de l'air demeure le plus longtemps bleue ou verte. Les solutions décolorées agitées à l'air verdissent ou bleuissent rapidement.

Les solutions vert pré obtenues par action de la potasse sur une solution bleue ou bleu violette se décolorent vite. Elles peuvent se recolorer de même en passant par le vert pour arriver au bleu sous l'action d'une agitation à l'air.

Extraction du pigment

CHAMOT et THIRY ont constaté que les pommes de terre étaient un milieu de choix pour la production du pigment bleu indigo. C'est donc à ce substratum qu'ils se sont adressés pour extraire le pigment.

A cet effet les pommes de terre alcalinisées,ensemencées avec le Bacille polychrome et devenues d'un bleu indigo intense dans toute leur masse, étaient coupées en petits morceaux et exposées à l'air en grande surface. Le pigment ayant foncé légèrement, ces Savants épuisaient plusieurs fois

cette masse par de l'eau ou de l'alcool dilué. Si on opère sur de gros morceaux de pomme de terre on obtient des solutions de coloration insuffisante et instable. Les tubercules prennent assez rapidement une teinte rouille alors que la solution se décolore.

Purification du pigment

Procédé CHAMOT

On traite par l'alcool dilué des cultures sur pommes de terre alcalinisées par la soude et additionnées de phosphate de chaux. On filtre sur bougie Chamberland et rejette les cinquante premiers centimètres cubes, qui sont d'un rouge pourpre. Le liquide recueilli sans changer de couleur est évaporé à 50° C. jusqu'à consistance sirupeuse (on ne doit pas dépasser 60° C. sinon il y a réduction du pigment). La matière colorante bleu foncé est précipitée par l'alcool fort. Le précipité solubilisé dans très peu d'eau distillée est de nouveau précipité par l'alcool fort. En répétant cette opération et desséchant le produit, on obtient une poudre amorphe gris bleu qui se dissout dans l'eau en donnant une magnifique couleur bleu pur.

Les auteurs n'ont pu obtenir la cristallisation de cette substance.

Action des acides et des alcalis

Les filtrats verts plus ou moins dichroïques des cultures sur gélatine peptone déjà liquéfiée, additionnés de quelques gouttes de potasse ou de soude en solution étendue, présentent un dichroïsme accentué. Un léger excès d'alcali détruit toute teinte rouge et fait apparaître un vert plus brillant. L'ammoniaque fait virer la coloration verte au rouge léger.

Les acides minéraux ou organiques font virer le vert au rouge. Le rouge violet obtenu est variable suivant les acides utilisés. Un excès d'acide décolore complètement. Les filtrats violet rouge ou violet bleu, de cultures obtenues sur gélatine peptone glucose, virent au bleu sous l'action des alcalis étendus. L'ammoniaque au contraire accentue la teinte rouge ; les acides font virer le bleu au violet, puis au rouge.

Les filtrats bleu indigo des cultures sur pomme de terre sodée passent à une teinte violette puis bleue avec les alcalis fixes. Lorsque ceux-ci sont en grand excès on a un vert gazon pur.

Sous l'action de l'ammoniaque le bleu vire au violet, rouge violet pourpre. Sous l'action des acides organiques le bleu vire au violet puis au rouge violet. Par les acides minéraux le bleu se change en violet, virant au rouge

plus ou moins pourpre suivant l'excès d'acide utilisé. Un grand excès d'acide décolore cependant.

Les couleurs primitives de chacun des filtrats se régénèrent par neutralisation de l'acide ou de l'alcali.

Spectre d'absorption

1° *Solution bleue*. — Les solutions aqueuses bleu clair donnent une bande d'absorption dont l'intensité est à $\lambda = 594$ pour un pigment très pur.

Dans le rouge on note un assombrissement léger du spectre, ainsi que dans le bleu et le violet. L'addition d'acide aux solutions bleues produit un déplacement de la bande principale d'absorption vers le violet et un accroissement double de l'intensité. L'addition d'ammoniaque en excès produit un léger déplacement de la bande principale en même temps qu'une grande diminution d'intensité.

2° *Solution verte*. — Les solutions vertes non dichroïques provenant de jeunes cultures filtrées, dont on n'a pas recueilli les premières portions de filtrat, ne donnent pas ou donnent une absorption très légère dans le voisinage de la raie D. L'addition d'un peu d'acide produit un léger dichroïsme et une faible bande apparaît.

3° *Solution violette*. — Avec les solutions violettes la bande principale est déplacée vers la droite.

A la suite de ses remarquables recherches THIRY (1900) a émis l'hypothèse suivant laquelle les différentes colorations sont dues à une seule et même substance. L'organisme ne produit pas dans les différents milieux des pigments différents comme on pourrait le supposer.

II. — VIOLACÉINE

La production du pigment violet a été signalée chez de nombreuses Bactéries. C'est ainsi que l'on peut citer : *B. violaceus* ZIMMERMANN (ZOPF), ADAMETZ, MACÉ, EISENBERG, FRAENKEL, NIEMAN.

B. janthinum ZOPF, *B. janthinus* ZIMMERMANN LEHMANN et NEUMANN.

B. membranaceus amethystinus EISENBERG.

B. membranaceus amethystinus mobilis GERMANO.

B. violaceus Laurentius.

B. berolinensis indicus CLAESSEN.

B. viscofucatus HARRISON et BARLOW.

Les descriptions de tous ces germes sont excessivement brèves et ne permettent pas la justification d'un aussi grand nombre d'espèces.

LASSEUR fait remarquer que le caractère de motilité permettrait de grouper toutes ces Bactéries en deux catégories, les unes étant mobiles, les autres immobiles. Il souligne cependant combien ce caractère est sous la dépendance de nombreux facteurs; en outre si l'existence d'organes moteurs est prouvée par cette possibilité de déplacement, les fouets peuvent exister cependant chez les plastides temporairement ou définitivement immobiles.

Quelques Savants seulement ont signalé la présence de ces organes moteurs et il serait nécessaire de procéder à une revision de ce groupe.

LASSEUR a extrait d'une culture de Bacille violet effectuée sur milieu synthétique, une matière colorante violette.

Extraction

LASSEUR a utilisé la technique suivante :

Les voiles obtenus sur milieu nutritif étaient lavés soigneusement à l'eau distillée puis desséchés dans le vide sur l'acide sulfurique après avoir été exprimés légèrement entre des feuilles de papier filtre. Le produit obtenu était pulvérisé et le traitement par l'alcool fort de cette poudre donnait un liquide que l'on additionnait d'un peu d'eau et l'on évaporait ensuite dans le vide à 40°-50° C. pour réduire le volume de la solution à quelques centimètres cubes. On obtenait alors des flocons violets que l'on dissolvait sur filtre avec de l'alcool faible. L'évaporation dans le vide précipitait une matière colorante qui était soumise à une série de purifications par solubilisation dans l'éther, puis dans l'alcool, etc...

A la fin de ces opérations LASSEUR obtenait une poudre noire, mate, sèche, qu'il purifiait par la méthode capillaire avant de la soumettre à l'analyse spectrale.

Propriétés du pigment violet

La matière colorante, insoluble dans l'éther de pétrole, la benzine et le sulfure de carbone, fournit des solutions de coloration variable suivant le solvant utilisé.

L'acide chlorhydrique et l'acide azotique ne paraissent pas dissoudre cette substance que l'acide sulfurique concentré solubilise facilement en donnant une liqueur jaune orange.

Les solutions alcooliques de violacéine virent au bleu sous l'action de l'acide chlorhydrique et sulfurique tout en présentant des variations importantes du spectre d'absorption.

La matière colorante donne avec la soude concentrée une solution verte passant rapidement au jaune orangé.

L'ammoniaque, qui se dissocie beaucoup moins que la soude, paraît être sans action sensible. La soude agit beaucoup plus facilement sur les solutions alcooliques de matière colorante.

Les oxydants tels que l'eau oxygénée à 100 volumes, les perborates, etc... qui n'ont pas d'action à la température ordinaire décolorent ces solutions à la température de 50° C.

Spectre d'absorption

Pour caractériser les violacéines, les propriétés chimiques ne suffisent pas; il est nécessaire d'avoir recours à l'étude du spectre d'absorption.

Les spectres d'absorption des violacéines ont été étudiés par de nombreux auteurs. En particulier LECOQ DE BOISBAUDRAN a caractérisé en 1882 une bande d'absorption dont le milieu apparent avait lieu vers $\lambda = 581$ pour un pigment violet d'origine bactérienne se produisant dans certaines colles de farine.

J. HARTLEY (1913) a étudié à l'aide de la méthode imaginée par son père, le pigment sécrété par le Bacille violet de l'eau; la solution alcoolique du pigment ne fournissant pas d'absorption sélective dans l'ultra violet, offre une seule bande d'absorption s'étendant de $\lambda = 6.439$ à $\lambda = 5.000$ environ dans le spectre visible, pour une solution alcoolique renfermant 22 mmgr. pour 10 cm³ d'alcool sous une épaisseur de 5 mm. Lorsque la solution alcoolique renferme 22 mmgr. pour 80 cm³, sous une épaisseur de 5 mm. la bande d'absorption s'étend de $\lambda = 6.439$ à $\lambda = 6.000$.

Les expériences reprises par LASSEUR et GIRARDET sur des solutions alcooliques (à 5 mmgr., 3 % de matière colorante) leur ont permis d'observer une large bande d'absorption asymétrique en même temps qu'une absorption continue du violet. Par dilution de la solution alcoolique con-

centrée, la bande d'absorption se dédouble en deux bandes dont les maxima de FORMANEK-GRANDMOUGIN sont reproduits dans le tableau suivant :

Désignation des Bandes	Maximum de Formanek-Grandmougin
1 ^e bande	$\lambda = 629,6$
2 ^e bande	$\lambda = 581,5$

La bande 1 est très faible, nébuleuse. Cette bande est facilement perceptible lorsqu'on opère sur des solutions très diluées dont on fait varier l'épaisseur.

La bande 2 est assez faible.

L'addition d'acide sulfurique fait varier considérablement le spectre d'absorption de la violacéine qui présente alors trois bandes d'absorption.

Nous reproduisons dans le tableau suivant le maximum de FORMANEK-GRANDMOUGIN pour des solutions alcooliques (concentration 26 mmgr. de substance colorante pour 100 centimètres cubes de solvant) additionnées de 2 centimètres cubes d'acide sulfurique pour 100 centimètres cubes de liquide.

Maximum de Formanek-Grandmougin	Observations
1 ^e bande.... $\lambda = 704,8$	bande forte
2 ^e bande.... $\lambda = 637,5$	bande nébuleuse
3 ^e bande.... $\lambda = 586,8$	bande très faible mais persistant longtemps

Pour certaines épaisseurs la deuxième bande n'est nettement visible qu'avec un verre absorbant.

Dans l'ultra violet le spectre d'absorption de la violacéine n'est pas très caractéristique. On note deux bandes d'absorption. L'addition d'acide sulfurique dans des solutions alcooliques ne modifie pas sensiblement le spectre d'absorption.

En comparant les spectres d'absorption de la solution verte d'oxychloraphine réduite et de la solution bleue du pigment violet, il est curieux de constater que les trois premières bandes d'absorption de ces deux pigments auraient lieu pour une même longueur d'onde. Ces résultats ont fait écrire à LASSEUR et GIRARDET (1926) : « *qu'il était possible que la*

solution verte d'oxy-chlororaphine réduite soit un mélange de deux colorants: l'un bleu (B), l'autre jaune (J) ».

La solution sulfurique bleue du pigment violet renferme en toute évidence un colorant bleu B'. Les colorants B et B' possèdent certainement des groupements communs. Cette hypothèse paraît d'autant plus vraisemblable que les récents travaux de KÖGL et ses Collaborateurs, de WREDE et ses Collaborateurs rapprochent la pyocyanine de la chlororaphine.

PIGMENT DU BACILLE VIOLET DE HARTLEY

W.-J. HARTLEY a étudié en 1913 un Bacille identique à *B. violaceus*. Il préconise pour la culture de ce germe un milieu favorisant la production de pigment ainsi composé :

Chlorure de sodium.	0 gr. 5
Phosphate de potassium.	1 gr.
Sulfate de magnésium.	0 gr. 5
Chlorure de calcium.	traces
Carbonate de magnésie.	0 gr. 0,3
Eau distillée.	1000 cm ³

Cette solution fut divisée en 5 parties. Chaque partie reçut 3 % de gélose. Une partie fut laissée ainsi. Les quatre autres parties reçurent respectivement : soit 3 % de glucose, soit 2 % de lactose, soit 2 % d'amidon, soit 1 % d'urée ou de peptone. Les milieux les plus favorables à la production de pigment furent ceux contenant du lactose ou de l'amidon. La production d'un pigment abondant se manifestait en six jours de culture à 20° C.

Extraction du pigment suivant la technique de HARTLEY

Pour préparer le pigment, HARTLEY utilise une culture sur pomme de terre. Les corps microbiens sont épuisés par l'alcool absolu au soxhlet. Le liquide ainsi obtenu est mis à décanter huit jours durant. On obtient ainsi un liquide violet ne contenant plus d'amidon provenant de la pomme de terre. La solution évaporée dans le vide laisse déposer une masse amorphe violette, presque noire, donnant en solution alcoolique une teinte violette. Ce pigment est soluble dans l'éther et le chloroforme. Les réac-

tions furent étudiées ainsi : On répartit dans dix tubes 1 cm³ 5 de solution alcoolique de pigment, on ajoute ensuite :

- Tube n° 1. — 0,5 cc. de solution de potasse normale : la couleur vire au bleu, puis au vert, puis au jaune.
- Tube n° 2. — 0,5 cc. de solution de carbonate de soude normale : la teinte violette vire au bleu foncé.
- Tube n° 3. — 0,1 cc. d'acide sulfurique concentré : la teinte violette vire au vert.
- Tube n° 4. — 0,3 cc. d'acide sulfurique concentré : la teinte violette vire au jaune.
- Tube n° 5. — 0,3 cc. d'acide azotique : la teinte violette vire au jaune.
- Tube n° 6. — 0,2 cc. d'ammoniaque concentrée : la solution se décolore immédiatement ; l'addition ultérieure d'acide acétique ne ramène pas la coloration. L'ammoniaque diluée fait d'abord virer le pigment au vert avant d'en décolorer la solution.
- Tube n° 7. — 0,1 cc. d'eau de Brôme : la coloration disparaît immédiatement.
- Tube n° 8. — 0,5 cc. d'eau oxygénée : la teinte de la solution vire au bleu opalescent. Ceci semble dû à la précipitation des pigments par l'eau.
- Tube n° 9. — 0,5 cc. de chlorure d'étain : le pigment précipite.
- Tube n° 10. — 0,5 cc. d'éther : la solution prend une teinte pourpre.

Le pigment agit comme indicateur, vire au bleu avec les alcalis forts et au vert avec les alcalis faibles.

HARTLEY a tenté d'absorber le pigment avec de la craie, mais n'a pu y parvenir.

Le pouvoir tinctorial de ce pigment est très faible. Des échantillons de laine, soie, coton ne se colorent pas ; seule, la toile de lin prend une légère teinte bleue.

Une exposition de 12 heures au soleil décolore presque complètement une solution alcoolique. Une légère teinte rouge subsiste.

Spectre d'absorption

L'étude d'une solution de pigment contenant 0,22 gr. % de pigment fût faite au spectroscopie de ZEISS. Sous une épaisseur de 10 mm., il y avait absorption totale des rayons rouges. Le bleu et l'indigo étaient seuls trans-

mis. Sous une épaisseur de 5 mm., l'absorption allait de $\lambda = 640$ à $\lambda = 490$. Une transmission de rayons rouges s'effectuait de $\lambda = 670$ à $\lambda = 640$. Sous une couche de 25 mm. d'épaisseur l'absorption était totale.

Les expériences de HARTLEY (1913) tendraient à prouver que le pigment étudié par ce Savant serait différent de celui examiné par LASSEUR et GIRARDET. D'après ceux-ci HARTLEY ayant fait varier la concentration des solutions aurait certainement observé la deuxième bande, si elle avait existé. De plus au point de vue tinctorial les deux pigments se comportent de différentes façons.

En ce qui concerne les faits signalés par LECOQ DE BOISBAUDRAN, le maximum d'absorption $\lambda = 581$ qu'il a signalé, correspondrait au maximum attribué à la deuxième bande par LASSEUR et GIRARDET.

III. — PIGMENT SÉCRÉTÉ PAR *B. LE MONNIERI* LASSEUR

B. Le Monnieri sécrète un pigment bleu à côté d'un pigment fluorescent. Le colorant bleu imprègne le corps bactérien et existe en outre sous forme de grains très fins. Dans les cultures de *B. Le Monnieri*, LASSEUR et VERNIER (1925) ont décrit deux catégories de plastides : les unes peu colorées paraissent de structure homogène et relativement peu mobiles, les autres présentant au centre un gros grain chromatique d'un bleu plus foncé, celles-ci très mobiles.

Le pigment bleu sécrété par *B. Le Monnieri* est un colorant au sens de WITT. Il teint la soie en bleu ; sous l'action d'un lavage à l'eau la coloration bleue persiste. Elle vire au violet sous l'action de l'ammoniaque et verdit dans un acide fort, tout en se décolorant peu à peu. Le fait que la soie se colore en bleu dans une culture, implique une certaine solubilité dans l'eau, du colorant à l'état naissant, tandis qu'il serait insoluble ultérieurement.

Par les procédés habituels LASSEUR et VERNIER ont été dans l'impossibilité de faire cristalliser la substance bleue. Les formes cristallines si variables dans un même milieu, colorées en bleu ne peuvent se voir attribuer aucune valeur précise. Elles consisteraient peut-être en cristaux minéraux ou organiques, qui se seraient teints en bleu sous l'action du pigment.

Pour extraire la matière colorante bleue, LASSEUR a eu recours à la pyridine.

Il précipitait la matière colorante en solution pyridinique, à l'aide de

l'acide sulfurique dilué, puis résolubilisait le précipité obtenu dans la pyridine.

La matière pulvérulante obtenue après dessiccation, à la fin de ces opérations peut se conserver durant des années; mais elle donne des solutions très instables.

L'étude du spectre d'absorption dans l'ultra-violet a été effectuée sur le pigment purifié à l'aide de la méthode de GOPPELSRÖDER.

Propriétés de la matière colorante

Insoluble dans l'eau et les solvants neutres le colorant est soluble en bleu dans les acides acétique et lactique. Les solutions obtenues sont peu stables et verdissent rapidement au contact de l'air. Par réduction des solutions acétiques vertes il est possible de régénérer la coloration bleue en opérant, toutefois, avec prudence sinon on provoque une décoloration totale.

Les solutions acétiques précipitent en violet bleu sous l'action de l'ammoniaque et de la soude, additionnées de façon lente. Le précipité fraîchement obtenu par l'action d'acide sulfurique dilué dans les solutions pyridiniques est soluble dans le chloroforme.

L'oxydation décolore les solutions pyridiniques; l'acide chlorhydrique verdit la matière colorante; il en est de même de l'acide azotique au tiers; dans ce dernier cas le colorant passe presque instantanément au jaune.

Spectre d'absorption

(Voir planches spectrogrammes)

LASSEUR et GIRARDET ont étudié l'absorption de solutions pyridiniques de concentration variée en pigment bleu. Avec les solutions concentrées ils ont observé une large bande d'absorption et une absorption continue de l'extrémité du spectre. La dilution des solutions utilisées leur a fait assister à une fragmentation de la bande d'absorption en deux bandes.

Les maxima obtenus pour une concentration de 5. mmgr. de substance pour 100 cm³ de pyridine sont résumés dans le tableau suivant:

Maximum de Formanek-Grandmougin	Observations
1 ^{re} bande... $\lambda = 630,3$	bande fortement asymétrique
2 ^e bande... $\lambda = 578,5$	bande plate nébuleuse

Pour étudier l'absorption dans l'ultra-violet la pyridine n'a pu être uti-

lisée, étant très absorbante dans cette zone du spectre. LASSEUR et GROSS ont dû avoir recours comme solvant à un mélange d'acide acétique et de chloroforme. Ils ont pu constater ainsi l'existence de deux bandes d'absorption.

IV. — PYOCYANINE

Bacillus pyocyaneus GESSARD peut produire quatre pigments : une substance bleue la pyocyanine de FORDOS, une substance fluorescente, une matière colorante rouge et un pigment mélanique.

La fluorescence, vu sa fréquence chez de nombreuses espèces bactériennes n'a pas grande valeur diagnostique. Les pigments rouge et noir ne définissent pas suffisamment l'espèce pyocyanique. La pyocyanine seule est spécifique et caractérise *B. pyocyaneus*.

GESSARD (1882) décrivait *B. pyocyaneus* comme un germe donnant trois sortes de pigments : un gris bleu soluble dans le chloroforme, un verdâtre insoluble dans le chloroforme et l'alcool, mais soluble dans l'eau, un rouge brun qui n'a pu être caractérisé au début.

Une étude plus approfondie due à BOLAND (1899) a montré qu'il fallait reconnaître deux pigments : l'un la pyocyanine avec son dérivé la pyoxanthose et l'autre la fluorescéine.

En ce qui concerne la pyoxanthose, BOLAND a supposé qu'elle était un dérivé de la pyocyanine. Il a constaté, en effet, que sous l'action des substances réductrices le pigment bleu devient jaune blanchâtre. Bien d'autres auteurs ont observé cette transformation de la pyocyanine. Si en solution chloroformique à l'air libre cette transformation s'effectue lentement, au soleil elle s'effectue beaucoup plus rapidement. Les rayons solaires agissant sur le chloroforme mettent en liberté, le chlore, auquel serait imputable cette transformation.

La fluorescence verte est due à une substance soluble dans l'eau mais insoluble dans l'alcool et le chloroforme ; ce n'est pas une particularité de *B. pyocyaneus* car elle est produite par d'autres Bactéries. Certaines espèces telles que *B. fluorescens* ne sécrètent que cette substance ; d'autres au contraire, telles que *B. Le Monnierii*, *B. chlororaphis*, *B. caryocyaneus*, *B. cyaneo-fluorescens*, etc... produisent un pigment bleu en même temps que le pigment fluorescent.

La fluorescence a été étudiée d'une façon magistrale au point de vue spectroscopique et spectrographique par DIHÉRE (1933) dont les remarquables travaux sont très connus des Biologistes.

Extraction de la Pyocyanine

En 1860 FORDOS isole à l'état cristallisé sous forme de prismes ou d'aiguilles d'un beau bleu, le pigment du Bacille du pus bleu auquel il donne le nom de pyocyanine.

La pyocyanine rougit par les acides et vire de nouveau au bleu par les alcalis tout comme le tournesol.

GESSARD (1899), à cause de certaines de ses réactions, la rapproche des bases organiques.

Les réducteurs la décolorent et la changent, comme l'indigo bleu, en dérivé blanc. L'agitation à l'air fait réapparaître la couleur bleue originelle.

L'extraction se fait grâce à la solubilité de la pyocyanine (base) dans le chloroforme. Par évaporation de cette solution chloroformique on obtient la pyocyanine cristallisée. GESSARD note cependant que d'autres substances ont pu passer dans le chloroforme et se retrouver dans le résidu de l'évaporation d'où, nécessité d'une purification.

Dans son étude sur les pigments microbiens LASSEUR a extrait la pyocyanine qui a servi pour ses expériences, par le procédé FORDOS GESSARD. Il évitait l'oxydation et la transformation partielle en pyoxanthose en effectuant les cristallisations dans le vide, celles-ci au nombre de trois.

Le chlorhydrate de pyocyanine, pratiquement stable à la température et à la pression ordinaires, se dissocie facilement dans le vide et à la température du Laboratoire.

En opérant sous une pression réduite, il est possible, en faisant durer l'opération plusieurs jours (sous un exsiccateur à acide sulfurique) d'obtenir un produit donnant dans l'eau une solution bleue.

Pour éviter l'altération rapide, LASSEUR dissout le chlorhydrate de pyocyanine dans très peu d'alcool absolu. Il le précipite de sa solution alcoolique à l'aide de l'éther anhydre. Cette opération répétée trois fois évite l'hydrolyse du sel.

Composition de la Pyocyanine

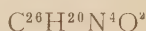
LEDDERHOSE (1888) attribuait à la pyocyanine la formule globale suivante :



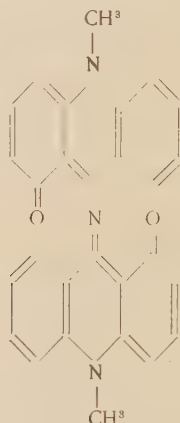
En 1916 MADINAVETTIA donnait à son hydrate la formule brute suivante :



Des recherches plus récentes dûes à WREDE et STRACK ont montré que la pyocyanine avait pour formule :



dont le schéma serait le suivant :



ce qui en ferait, selon la nomenclature chimique, un Bis [méthyle-10-oxo 1 tétrahydro-1.9.9.10 phénazindiyle 9.9']. Ou bien si l'on conçoit l'existence de la norpyocyanine, la pyocyanine naturelle serait le diméthyle 10.10' (norpyocyanine).

WREDE et STRACK (1929) ont réussi à faire la synthèse de la pyocyanine en chauffant à 100° C. pendant quelques minutes l'(α) Oxy-phénazine avec un diméthyle sulfate. Le produit de la réaction donne avec de l'eau et un alcali de la pyocyanine.

Spectre d'absorption

(Voir Planche spectrogrammes)

De très nombreux auteurs ont étudié le spectre d'absorption de la pyocyanine. C'est ainsi que l'on peut citer les travaux de GESSARD (1882), BABES (1889), CLUZET ROCHAIX et KOFMANN (1921).

LASSEUR et GROSS (1926) ont repris ces recherches en étudiant d'une part l'absorption dans la partie visible du spectre où celle-ci est peu caractéristique, d'autre part dans l'ultra-violet où la pyocyanine et son chlorhydrate offrent de magnifiques bandes d'absorption.

La pyocyanine présente deux belles bandes d'absorption; c'est ce qui résulte des expériences de LASSEUR et de ses Collaborateurs. La première

bande avait déjà été perçue par les savants lyonnais CLUZET, ROCHAUX et KOFMANN (1921).

L'étude des bandes d'absorption du chlorhydrate de pyocyanine ne présente pas des résultats nets. Les deux bandes sont fortes, la première est asymétrique, la deuxième ayant son maximum d'absorption difficile à préciser.

VELLINGER a étudié d'une façon remarquable (1933) les propriétés spectrales de la pyocyanine. Se servant du spectrophotomètre de KOENIG-MARTENS, il a déterminé le spectre du pigment pour toute l'étendue de l'échelle des pH. Pour calculer les constantes il a utilisé le poids moléculaire de 420, déterminé par WREDE et STRACK en 1924-28.

La forme bleue de la pyocyanine n'aurait pas de bande caractéristique dans le spectre visible. La forme rouge obtenue par lavage de la solution chloroformique avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique aurait une forte bande d'absorption dont le sommet est situé à $\lambda = 523$ environ.

VELLINGER a déterminé de même par voie spectrophotométrique la courbe représentant la dissociation du pigment en fonction du pH.

La constitution de la pyocyanine établie par WREDE et STRACK, qui la considèrent comme la combinaison de deux molécules d'oxophénazine substituée sur l'azote, ne serait pas d'après VELLINGER en harmonie avec les propriétés de dissociation du pigment.

D'après la courbe de dissociation à pH = 6, au moins 20 % du pigment se trouve sous la forme rouge d'où on est en droit de se demander si la forme rouge de la pyocyanine n'aurait pas un rôle dans la caractérisation de la variété érythroène de GESSARD.

PIGMENT JAUNE

B. pyocyaneus est susceptible de produire à côté de la pyocyanine un pigment qui entre certaines limites de réaction est jaune. Celui-ci résulterait de l'oxydation spontanée de la pyocyanine. Il serait cependant susceptible d'être sécrété directement par le Bacille.

Le pigment jaune est favorisé par les substances alcalines additionnées au milieu. Pratiquement inoxydable aux pH acides, la pyocyanine s'oxyderait rapidement à pH = 13.

La matière colorante jaune appelée encore pyoflavine est soluble dans le chloroforme en même temps que la pyocyanine. Pour son extraction on débarrasse donc le chloroforme de la pyocyanine et on le traite par une

solution de soude N/10 qui le décolore et prend en même temps une coloration rouge. Après acidification le pigment s'extrait de nouveau par le chloroforme. L'évaporation de la solution chloroformique dans le vide permet d'obtenir une masse cristalline se dissolvant dans une solution diluée de soude.

La pyo flavine présenterait deux virages, un à $\text{pH} = 8$ allant du jaune au rouge, un autre à $\text{pH} = 1,7$ allant du jaune au rouge orangé.

Spectre d'absorption

D'après VELLINGER la forme jaune n'a pas de bande caractéristique. La forme alcaline aurait au contraire une forte bande ayant son sommet à $\lambda = 515$ environ. La forme acide présenterait une forte bande dont le sommet serait situé à $\lambda = 500$.

WREDE et STRACK ont donné une formule de constitution de ce pigment représentant la moitié de la molécule de pyocyanine avec un groupement oxhydryle phénolique dont ils ont fait l'hémipyocyanine.

Le point isoélectrique de la pyocyanine qui serait d'après VELLINGER un ampholyte est situé à $\text{pH} = 4,8$. C'est au groupement oxhydryle phénolique qu'il faut attribuer le caractère acide de cette substance.

A des pH supérieurs à 7 le pigment jaune vire au rouge, c'est ce qui résulte de la courbe de dissociation établie par VELLINGER.

INFLUENCE DE QUELQUES SUBSTANCES SUR LA PRODUCTION DE LA PYOCYANINE

Dans son travail sur « *Variation et Mutation en Bactériologie* » MARCHAL (1932) a consacré une partie de ses recherches à l'étude de l'influence des éléments entrant dans la composition du milieu synthétique L1 de LASSEUR sur la fonction pyocyanogène.

De ces recherches nous retiendrons les points particuliers suivants :

Le pigment bleu et le pigment rouge sécrétés par les germes pyocyaniques peuvent apparaître dans les milieux pauvres en phosphores, tandis que le pigment fluorescent exige, au contraire, la présence d'une quantité notable de phosphate dipotassique dans les milieux de culture.

En l'absence de magnésium la fonction pyocyanogène ne peut elle-même paraître comme toutes les fonctions chromogènes de ce germe.

Les cultures de *B. pyocyanus* effectuées en milieu dépourvu de magnésium présentent la remarquable propriété, décrite par LAGRANGE en

1927, sous le nom de propriété gommogène chez les Bacilles fluorescents.

Nous avons déjà eu l'occasion d'envisager le rôle du fer dans la chromogénèse bactérienne. Nous n'y reviendrons pas davantage, nous signalerons seulement son rôle important dans la production de la pyocyanine qui est grandement favorisée par sa présence.

La fonction pyocyanogène est de même influencée par la concentration en ions H^+ du milieu. Le pH des milieux de culture peut entraver son apparition ou influencer d'une façon considérable sa précocité et son intensité. C'est ainsi que la pyocyanine apparaît plus tôt dans un milieu synthétique L1 de pH supérieur à 7,5, tandis que son apparition dans des milieux de pH alcalins ou acides est plus tardive.

V. — CARYOCYANINE

C'est à A. DUPAIX (1933) que revient le mérite d'avoir étudié la caryocyanine. Bien que notre distinguée collègue n'ait pas déterminé la constitution chimique de la caryocyanine, laissant ce soin au Savant hollandais KÖGL, qui s'est spécialisé dans l'étude de la formule des matières colorantes d'origine bactérienne, elle n'en a pas moins apporté des documents très importants concernant le pigment fourni par *B. caryocyaneus* BEIJERINCK DUPAIX.

En dehors de la bactériofluorescéine des auteurs que fournit *B. caryocyaneus*, ce germe donne naissance à une substance colorée variant du bleu ciel au noir en passant par le bleu violet, à laquelle BEIJERINCK a donné le nom de caryocyanine.

Les plastides de *B. caryocyaneus* examinées sous une épaisseur de quelques centimètres paraissent colorées en bleu foncé ou en noir, ce que l'on n'observe pas sous une épaisseur de quelques μ . Une certaine quantité de pigment serait de même entraînée dans le liquide résultant de la centrifugation d'une culture.

Ces faits ont amené A. DUPAIX à conclure en ce qui concerne le siège de la caryocyanine, que le pigment pouvait « être distribué primitivement dans toute la masse du cytoplasme ou fixé secondairement par absorption, soit sur la membrane, soit sur différents points du cytoplasme », dans les conditions de ses expériences.

La caryocyanine est un chromogène ou un colorant au sens de WITT.

En effet, il a été possible de colorer des floches de soie dans un ballon renfermant du liquide synthétique L2 où *B. caryocyaneus* s'était développé.

De même des cultures mixtes de *B. caryocyaneus* et d'*Endomyces albicans* lui ont permis d'obtenir une membrane blanche entourant le contenu cellulaire du champignon coloré en bleu vert.

Extraction de la caryocyanine

Par centrifugation A. DUPAIX a séparé les corps microbiens du liquide contenant en dissolution ou en suspension la fluorescéine et la caryocyanine.

En utilisant tous les réactifs employés pour l'extraction des pigments et en ayant recours aux deux procédés préconisés par LASSEUR: d'une part l'analyse capillaire, d'autre part le sulfate d'ammoniaque et l'acétone, il ne lui a pas été possible d'extraire la caryocyanine. De même la pyridine qui a permis à LASSEUR d'isoler le pigment bleu sécrété par *B. Le Monnier* n'a fourni aucun résultat.

Action des substances chimiques sur la caryocyanine

L'ammoniaque et la potasse ajoutés à une culture de *B. caryocyaneus* colorée en bleu, déterminent la production d'une coloration verte intense de la culture en même temps qu'un précipité de caryocyanine. Celui-ci est soluble dans l'acide chlorhydrique qui régénère en même temps la coloration bleue.

Il faut noter toutefois que celle-ci passe peu à peu à une teinte gris ardoise.

A. DUPAIX a démontré que l'eau oxygénée à 20 volumes provoquait une atténuation profonde de la coloration des cultures de *B. caryocyaneus*.

L'acide perchlorique ne détermine ni modification de la coloration, ni formation de précipité.

La poudre de zinc ajoutée au filtrat d'une culture colorée en bleu, la décolore partiellement.

Une réduction plus énergique effectuée à l'aide de poudre de zinc et d'acide chlorhydrique détermine une disparition graduelle de la coloration bleue.

D'après A. DUPAIX la comparaison des pigments sécrétés par *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens* permettrait de rapprocher ces deux germes donnant des pigments bien voisins.

Spectre d'absorption

(Voir planches spectrogrammes.)

Etant donné l'impossibilité dans laquelle l'auteur a été d'extraire la caryocyanine, le spectre d'absorption dans l'ultra-violet ne pouvait être déterminé. Néanmoins appliquant la technique de LASSEUR (1926), A. DUPAIX a examiné le spectre d'absorption de cette substance dans la partie visible du spectre. Pour cela le maximum d'absorption a été déterminé suivant le procédé de FORMANECK-GRANDMOUGIN sous des épaisseurs de liquide de plus en plus grandes. Les résultats de ces recherches ont montré que la caryocyanine offrait une absorption sélective, c'est-à-dire une bande d'absorption dont le maximum est à $\lambda = 588,5$.

Cette bande très forte, asymétrique ne serait pas déplacée d'une façon sensible par addition d'acide. Il en serait de même par addition de bases ; mais, celles-ci détermineraient une précipitation et une diminution corrélatives de l'intensité de l'absorption.

TROISIÈME PARTIE

CLASSIFICATION ⁽¹⁾

La production des pigments bleus et violets a été comme nous venons de le voir, signalée chez de nombreuses Bactéries. La création d'un aussi grand nombre d'espèces n'est, il faut l'avouer, nullement fondée; la plupart de ces germes ont été décrits il y a déjà longtemps. Certains ont disparu, d'autres existent encore dans les collections. Les auteurs qui les ont étudiés ont laissé souvent des notes trop brèves, ne donnant pas des points de repère suffisants pour pouvoir rapporter les germes décrits à une même espèce ou à des espèces différentes.

Tenter une classification des Bactéries bleues et violettes peut donc paraître quelque chose d'illusoire. Néanmoins il est possible de diviser ces germes en un certain nombre de groupes et faire des rapprochements qui permettront ultérieurement d'aboutir à une classification.

Il faut en effet, comme nous avons déjà eu l'occasion de l'envisager, faire appel à un très grand nombre de caractères particulièrement bien choisis, pour pouvoir définir une espèce. Et chez les germes chromogènes, une place toute spéciale doit être réservée à l'étude du pigment.

Malgré les difficultés rencontrées, et devant l'importance du rapprochement, de nombreux savants ont tenté une classification, du moins provisoire, en Bactériologie.

Nous citerons parmi ceux-ci EHRENBURG (1838), NÆGELI (1857), COHN

(1) Pour rédiger ce chapitre sur la classification, nous avons fait appel au travail de notre collègue A. DUPAIX, paru dans le *Bull. de l'Assoc. des Diplômés de Microbiologie*, n° 4, 1932. — Nomenclature. Place de *B. caryocyanus* BEIJERINK-DUPAIX dans la classification.

(1875-77-79), FLUGGE (1886), LEHMANN et NEUMANN (1896), FISCHER (1897), MIGULA (1897-1900), ERWIN SMITH (1905), VUILLEMIN (1913), BUCHANAN (1915-16-17-18), le comité des Bactériologistes Américains (1923).

Dans cette énumération nous ne citerons que les travaux les plus importants. Il n'est pas possible de faire une étude critique de toutes ces classifications, qui sont loin d'être en parfait accord.

Néanmoins en ce qui concerne les germes qui nous intéressent il est nécessaire de voir sous quelles étiquettes nous pouvons les ranger.

EHRENBERG avait admis trois genres en considérant la forme et la nature du mouvement en Bactériologie: *Spirochaeta*, *Spirillum* et *Bacterium*. Ce dernier genre était représenté par des éléments rectilignes possédant des fouets polaires et se déplaçant en oscillant par saccades.

Depuis lors, le genre *Bacillus*, dont le créateur fut COHN, englobe déjà depuis longtemps, comme le faisait remarquer VUILLEMIN en 1913, des Bactéries immobiles et des espèces possédant des fouets.

LEHMANN et NEUMANN (1896) attachant une importance capitale à la présence ou à l'absence de spores endogènes, avaient établi une distinction entre *Bacterium* et *Bacillus*.

En 1900 MIGULA avait restreint le sens de ces différents mots et avait ajouté un troisième genre, celui de *Pseudomonas*. Dans celui-ci les espèces possédaient des cellules courtes et cylindriques et présentaient des fouets polaires. Les genres *Bacterium* et *Bacillus* étaient eux-mêmes constitués par des cellules cylindriques. Cependant le genre *Bacterium* ne possédait pas de fouets tandis que le genre *Bacillus* était pourvu de fouets diffus.

THIRY (1900) à la suite de recherches comparatives effectuées sur de nombreux Bacilles bleus et violets et après lecture de tous les travaux écrits sur ce sujet a cru pouvoir établir un classement d'attente. Dans ce but il s'était basé sur le caractère le plus superficiel et le plus commode à apprécier. De cette manière il avait établi la succession des groupes suivants, concernant les Bacilles chromogènes.

1° Groupe composé de *Micrococcus cyaneus*, *Micrococcus pseudocyanus*, *B. lacmus*;

2° Groupe composé des Bactéries proprement dites: *B. cæruleus*, *B. pavoninus*, *B. indigonaceus*, *B. indigoferus*;

3° Groupe composé des Bactéries violettes proprement dites : *B. violaceus*, *B. janthinus*, *B. lividus*, *B. amethystinus*;

4° *B. cyaneofuscus*;

5° *B. polychromogenes*.

Les espèces du premier groupe ne sont connues que par des descriptions très brèves et il a paru à THIRY (1900) qu'il était impossible de différencier entre elles les espèces des groupes 2 et 3 qui nécessiteraient des études nouvelles.

MIGULA, dans sa classification, a rangé dans le genre *Pseudomonas* des Bactéries bien différentes ce qui fait perdre à ce groupe son homogénéité. C'est ainsi que l'on y trouve à la fois des Bactéries fluorescentes à plusieurs fouets polaires, des Bactéries fluorescentes péritriches et des germes tels que *Bacterium violaceum* SCHRÖTTER, *B. caeruleus* VOGES, *B. indigoferus* VOGES.

La classification américaine réunit par contre dans le genre *Pseudomonas* des germes à affinités bien lointaines et en sépare d'autres possédant des affinités incontestables.

A. DUPAIX (1933), a souligné quelques-unes des erreurs de la classification américaine; beaucoup d'autres seraient encore à signaler. Néanmoins le genre *Pseudomonas* MIGULA ou « emended » des auteurs américains serait susceptible d'être conservé si on le limitait à des espèces présentant des plastides cylindriques ou ovalaires, munies de fouets polaires et sécrétant un pigment bleu ou vert.

C'est ainsi que sous ce nom on grouperait : *B. pyocyaneus* GESSARD, *B. caryocyaneus* BEIJERINCK DUPAIX, *B. liquefasciens* TATARFF, *B. violaceus* G. et P. FRANKLAND, *Ps. berolinensis* CLÆSSEN.

Au début de l'exposé de ce travail nous avons adopté la classification proposée par THIRY. Malheureusement depuis la publication de l'ouvrage de ce savant, de nombreuses Bactéries nouvelles, sécrétant des pigments bleus ont été décrites. Certaines d'entre elles ont manifesté des affinités que nous avons tenté de préciser.

Il nous a donc fallu comparer entre elles des espèces beaucoup plus complexes que les espèces bleues et violettes. En effet, les nouveaux germes décrits possèdent en même temps que la propriété de sécréter un pigment bleu ou vert, celui de produire simultanément un pigment fluorescent, dans les milieux nutritifs. C'est pour cette raison qu'en étudiant les Bactéries bleues et violettes nous avons été obligé d'envisager *B. caryocyaneus*, *B. pyocyaneus*, *B. cyaneo-fluorescens*.

Pour être complet il faudrait rattacher aux germes sécrétant une matière fluorescente verte et un pigment bleu, bleu violet, les Bactéries fluorescentes. Ceci serait sorti du cadre de ce travail et nous dirons seulement que *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX (1933), *B. pyocyaneus* GESSARD (1882), peuvent perdre la propriété de sécréter la caryocyanine ou la pyocyanine bien que possédant encore la faculté de produire la matière fluorescente. De même certaines Bactéries comme *B. cyaneo-fluorescens* ZANGEMEISTER fabriquant un pigment bleu, sont susceptibles d'acquérir la faculté de produire une substance fluorescente. *B. cyaneo-fluorescens* peut être considéré comme un germe identique à *B. syncyaneus* dont le pouvoir fluorescigène serait exalté.

Dans son remarquable travail A. DUPAIX (1933) a étudié quelles étaient les affinités de *B. caryocyaneus* vis-à-vis de germes sécrétant comme lui un pigment bleu ou bleu violet en même temps qu'une fluorescence.

Nous résumons dans le tableau suivant les caractères comparatifs de *B. caryocyaneus* et de *B. cyaneo-fluorescens*.

De ces recherches il résulte qu'il existe des différences essentielles dans les caractères morphologiques et cultureux de *B. cyaneo-fluorescens* et de *B. caryocyaneus*.

De plus l'étude des caractères sérologiques de ces deux espèces a montré qu'il n'y avait aucune parenté entre ces deux germes.

Etude comparative de *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens*

(In. DUPAIX 1933).

CARACTÈRES
envisagés

B. caryocyaneus
BEIJERINCK-DUPAIX

B. cyaneo-fluorescens
ZANGEMEISTER

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme	plastides parfois ovales, le plus souvent en bâ- tonnets.	plastides ovales.
Fouets	1 fouet polaire. (LASSEUR VERNIER, DUPAIX, ZAHL, 1930).	1 à 3 fouets polaires.
Coloration par la méthode de Gram	ne prend pas le Gram dé- coloré en 5 secondes.	prend le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Gélatine	liquéfie la gélatine.	ne liquéfie pas (ZAN- GEMEISTER, 1895, MI- GULA 1900, LASSEUR et THIRY 1900. MATZSCHITA 1902).
Milieu synthétique L1 . .	fluorescence verte, pig- ment bleu devenant vio- let puis noir.	fluorescence verte.
Milieu synthétique L2 . .	pigment bleu violet. .	pigment bleu violet.
Lait	coloration bleu ardoise. régulièrement dégradée. peptonisation.	très légère teinte grise.
Pomme de terre glycéri- née	le tubercule est entière- ment recouvert d'un en- duit très foncé deve- nant noir cirage.	enduite brun noir.

CARACTERES SEROLOGIQUES.

Dilution limite d'aggluti- nation en présence de sérum <i>B. caryocyaneus</i>	1/100.000
---	-----------

De l'ensemble des faits constatés A. DUPAIX sépare d'une façon nette ces deux germes mais rapproche de *B. caryocyaneus* une Bactérie isolée de l'air par MILDENBERG en 1922, à laquelle cet auteur n'a pas donné de nom, s'étant contenté de l'étudier comparativement avec *B. cyanogenus*. Les caractères donnés par cet auteur bien qu'incomplets, car ils ne font pas appel aux caractères sérologiques dont l'importance est si grande en Bactériologie pour déterminer la parenté des espèces, permettent cependant de distinguer *B. caryocyaneus* du Bacille bleu de MILDENBERG. C'est ce qui résulte du tableau suivant.

Caractères différentiels de *B. caryocyaneus*
et du Bacille bleu de MILDENBERG
(In. DUPAIX 1933)

CARACTÈRES envisagés	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	Bacille bleu de MILDENBERG
Fouets.	1 fouet polaire.	1 à plusieurs fouets polaires.
Coloration des colonies.	blanc jaunâtre. le milieu nutritif présente une teinte verte puis une coloration brune.	bleu acier devenant bleu foncé puis vio- let pourpre. Après 3 à 4 semaines la coloration passe au bleu vert puis au vert et pâlit peu peu.
Culture en bouillon....	trouble intense, voile grimant irisé, plissé ; fluorescence verte in- tense.	trouble faible; pellicu- le; légère coloration vert jaune puis jau- nâtre du liquide.
Culture sur lait.	pas de coagulation; pep- tonisation : anneau noir; sur toute la hau- teur de la colonne li- quide stratification ré- gulière de zones, de coloration dégradées (gris-bleu, bleu ardoise, bleu vert).	coagulation partielle, le lait non caillé reste incolore.

ACTION DE DIFFÉRENTS RÉACTIFS CHIMIQUES SUR LES PIGMENTS

Ammoniaque.	coloration vert-pomme.	coloration bleu-violet sale.
Soude.	coloration vert-pomme.	coloration verte.
Acide chlorhydrique . . .	coloration bleu-violet.	coloration rouge.

Dans son travail A. DUPAIX a montré de même que bien des caractères séparaient *B. caryocyaneus* de *B. pyocyaneus* et que malgré la tentative faite par BEIJERINCK il n'était pas possible de rapprocher ces deux germes d'aucune manière. C'est ce qui ressort du tableau suivant :

Différenciation de *B. caryocyaneus* et de *B. pyocyaneus*
(In. DUPAIX 1933)

CARACTÈRES différentiels	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	<i>B. pyocyaneus</i> <i>pyocyano</i> genes GESSARD
Odeur des cultures.....	odeur putride	odeur de coumarine
Dilution limite d'agglutination en présence de sérum <i>B. caryocyaneus</i>	1/100.000	O
Spectre d'absorption du pigment dans la partie visible du spectre....	à $\lambda = 616.5$ à 610 $\lambda = 578$ à 570	$\lambda = 730$ à $\lambda = 641$ (LASSEUR et GROSS, 1926)
Pouvoir pathogène pour les animaux à sang chaud.	germe dépourvu de pouvoir pathogène.	germe pathogène.

Faisant appel à la notion de parenté humorale A. DUPAIX a déterminé des affinités que la morphologie et les caractères cultureux n'étaient pas susceptibles de déceler.

De ces expériences effectuées avec des sérums de lapin préparés avec des germes tels que *B. chlororaphis*, *B. caryocyaneus*, il résulte qu'avec un sérum *anti-caryocyaneus* (taux limite d'agglutination = 1/100.000), *B. chlororaphis* est agglutiné au 1/800 tandis que *B. cyaneo-fluorescens* n'est pas agglutiné à la dilution du 1/100. La caryocyanine constitue cependant un pigment plus voisin de celui sécrété par *B. cyaneo-fluorescens* que de la chlororaphine.

Si *B. chlororaphis* et *B. caryocyaneus* se rapprochent par certains de leurs caractères morphologiques et cultureux ils se séparent absolument par la production de substances chromogènes différentes et par leur pouvoir pathogène vis-à-vis des animaux à sang chaud.

L'agglutination décèle également qu'il n'y a pas de parenté sérologique entre *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, *B. pyocyaneus pyocyano*genes GESSARD (1882), *B. cyanogenus* FLUGGE (1886).

Il résulte des travaux de THIERY et CHAMOT (1897-1900), LASSEUR et ses Collaborateurs, que le pigment de *B. polychromogenes* et celui de *B. Le Monnieri* sont nettement différenciés.

Les germes du lait bleu ont des affinités sérologiques indubitables avec *B. Le Monnieri* et *B. pyocyaneus*: « de cette constatation il ne faudrait pas conclure à une parenté étroite entre *B. Le Monnieri* et *B. pyocyaneus*. » (LASSEUR 1928).

Les germes sont en effet constitués suivant la conception de NICOLLE et ses élèves par une « mosaïque d'antigènes », plusieurs de ceux-ci pouvant se rencontrer dans des espèces cependant très différentes.

L'existence de ces combinaisons antigéniques est une source d'explication de toutes les relations sérologiques constatées, relations qui n'en respectent pas moins l'individualité de chaque espèce.

C'est ainsi que LASSEUR (1924) a montré qu'un sérum préparé avec *B. Le Monnieri* et agglutinant les germes homologues au 1/2.000, agglutinait seulement *B. cyaneo-fluorescens* au 1/50 et *B. syncyaneus* au 1/100. Le même sérum possédait la propriété d'agglutiner à un taux n'excédant pas le 1/30 différentes variétés de *B. pyocyaneus*, *B. violaceus*, *B. chlororaphis*.

L'épreuve de CASTELLANI (saturation des agglutinines) effectuée suivant la technique de LASSEUR, montre que :

B. Le Monnieri ne renferme pas d'agglutinines dites spécifiques pour *B. cyaneo-fluorescens*, ni pour *B. syncyaneus*. Au point de vue sérologique et en comparant les caractères biologiques il y aurait cependant une certaine parenté entre *B. Le Monnieri* et le Bacille du lait bleu.

L'étude des pigments sécrétés par les germes permet de même une séparation assez nette des espèces chromogènes. C'est ainsi que A. DUPAIX (1930) a montré que la caryocyanine était différente de la pyocyanine et du pigment sécrété par *B. cyanogenus*. Elle a signalé de même qu'il y aurait un rapprochement à faire entre *B. caryocyaneus* et *B. cyaneo-fluorescens*, les pigments de ces deux germes donnant dans la partie visible du spectre, le même maximum d'absorption de FORMANECK ($\lambda = 588,5$).

Et cependant les deux germes sont nettement différents.

Nous empruntons au travail remarquable de A. DUPAIX le tableau suivant, résumant l'action de quelques substances chimiques sur la caryocyanine et le corps coloré produit par *B. cyaneo-fluorescens*.

Action de quelques substances chimiques sur les pigments
sécrétés par *B. caryocyanus* et *B. cyaneo-fluorescens*
in. DUPAIX 1933.)

RÉACTIFS chimiques utilisés	LIQUIDE BLEU obtenu par filtration ou par centrifugation des cultures de <i>B. cyaneo-fluorescens</i>	LIQUIDE BLEU obtenu par filtration ou par centrifugation des cultures de <i>B. caryocyanus</i>
Potasse.	précipité vert soluble dans un excès de potasse avec formation d'une coloration brun rouge ou rouge brun. précipité vert soluble dans l'acide acétique avec production d'une teinte bleue.	précipité vert soluble dans un excès de potasse avec produc- tion d'une coloration brun rouge ou rouge brun. précipité vert soluble dans l'acide acéti- que avec formation d'une coloration bleue.
Ammoniaque.	précipité vert + acide acétique = coloration bleue.	précipité vert + aci- de acétique = colo- ration bleue.
Acide chlorhydrique. . .	coloration bleue + potas- se = coloration bleue.	coloration bleue + potasse = colora- tion bleue.
Acide perchlorique. . .	pas de changement de co- loration; ni précipité	légère coloration vio- lette; précipité.
Acide acétique.	pas de changement de co- loration.	pas de changement de coloration.
Tanin.	coloration verte et très léger précipité.	coloration verte et très léger précipité.
Perhydrol — eau oxygé- née.	décoloration partielle.	décoloration partielle.
Acide chlorhydrique + zinc.	disparition de la colora- tion; oxydation ulté- rieure = faible colo- ration violet brun.	
Poudre zinc.	décoloration partielle.	

Devant les difficultés rencontrées pour classer les Bactéries chromogè-

nes en se servant de leurs caractères cultureux on a tenté d'avoir recours à l'étude de l'origine du pigment pour opérer cette discrimination C'est ce que nous allons envisager maintenant.

CLASSIFICATION DES BACTÉRIES

D'APRÈS L'ORIGINE DE LEUR PIGMENT

La Bactérofluorescéine se rencontre chez de très nombreuses Bactéries chromogènes. Mais du fait de sa fréquence elle perd beaucoup de son intérêt en ce qui concerne la diagnose des espèces, si l'on s'en tient à l'étude qualitative. Il peut en être tout autrement lorsqu'on fait intervenir la notion quantitative.

La caryocyanine offre des nuances très variées du bleu ciel au noir en passant par le bleu violet, le violet rouge et le violet noir. Certaines Bactéries offrent des pigments tout à fait caractéristiques qui sont d'une grande utilité pour leur identification.

BEIJERINCK a divisé les Bactéries chromogènes en trois groupes principaux :

1° Bactéries chromophores où la matière colorante fait partie intégrante du corps microbien : B. sulfurées pourpres, Bactéries vertes, rouges, jaunes et brunes ne liquéfiant pas la gélatine.

2° Bactéries chromopares ou Bactéries pigmentées proprement dites. Le corps bactérien vivant est incolore et la matière colorante séparée comme telle ou comme matière chromogène incolore doit être considérée comme un produit d'excrétion sans utilité pour l'organisme : *B. prodigiosus*, *B. cyaneo-fuscus*, *B. cyanogenus*, *B. pyocyaneus*.

3° Bactéries parachromophores dont la matière est un point d'excrétion adhérent au corps microbien : *B. janthinus*, *B. violaceus*.

A. DUPAIX (1933) range sous le nom de Bactéries chromogènes, les Bactéries chromopares et les Bactéries parachromophores de BEIJERINCK. Il est très difficile d'observer la teinte d'une Bactérie car de nombreuses causes d'erreur interviennent dans cette étude : la coloration présentée est parfois très faible et les petites dimensions qu'offre une plastide rendent cette recherche particulièrement pénible. De plus, observées en masse, certaines Bactéries semblent être colorées de façon intense, alors que leur coloration ne paraît plus que très faible ou inexistante lorsque l'observation se limite à quelques éléments.

Un élément bactérien ne paraît coloré que si la plastide est suffisamment teintée.

VARIATION

Il ne faut pas oublier que l'étude des germes bactériens comme celle de tous les êtres vivants comporte de nombreuses causes d'erreur.

La Bactérie est susceptible de varier dans ses caractères du fait même qu'elle vit. Elle peut donc présenter des modifications dans sa morphologie, dans ses caractères biologiques, sérologiques, etc...

Dans son travail, paru en 1932, MARCHAL distingue chez les Bactéries des modifications apparaissant spontanément ou sous l'action de facteurs très variés. Il observe des variations temporaires se manifestant plus particulièrement par des modifications du pouvoir chromogène sous l'influence du milieu.

MARCHAL envisage un autre groupe de variations. Celles-ci « *se prolongent à travers les générations* », et sont de ce fait héréditaires.

Les modifications temporaires qu'il a observées faisaient retour au type primitif d'une façon plus ou moins rapide, selon l'intensité et le temps durant lequel l'excitation utilisée les avait engendrées.

Il est incontestable que des causes, infimes en apparence, peuvent déterminer des modifications profondes dans certaines manifestations vitales de la plastide bactérienne. Nous n'en voulons pour exemple que l'extrême sensibilité du pouvoir chromogène à des traces infinitésimales de métal: ce qui faisait naguère considérer la chromogénèse comme un attribut inconstant de la plastide.

En dehors des modifications que la Bactérie est susceptible de subir elle est encore sujette au curieux phénomène connu sous le nom de dissociation bactérienne, terme utilisé pour la première fois par HADLEY en 1927.

D'après les observations de nombreux Savants, une espèce bactérienne est susceptible de donner sur les milieux nutritifs solides sur lesquels on la cultive, deux aspects de colonie différents: l'un lisse appelé type S « *smooth* », l'autre granuleux appelé type R « *rough* ». Ces deux types se distinguent par leurs caractères morphologiques et biologiques.

Il existerait cependant de nombreux types intermédiaires ou de passage entre ces deux phases S et R. Des expériences nouvelles seraient à entreprendre sur ce sujet. Comme l'a montré MARCHAL en 1932 en parlant de

grande fréquence des cultures mixtes en Bactériologie, on ne peut parler de variation, de mutation, chez les Bactéries que lorsqu'on a la certitude de travailler sur une population « *ayant pour origine une seule plastide* » : sinon l'hypothèse de « *filtration des formes réadaptées* » au sens de DAVENPORT et CUÉNOT qui a été envisagée par LASSEUR en 1911 reprend ses droits.

Il est vraisemblable que les Bactériologistes eussent commis moins d'erreurs s'ils s'étaient toujours astreints à étudier les germes issus de plastides uniques, dont le développement aurait été observé scrupuleusement et s'ils s'étaient bornés à écrire des faits après avoir précisé d'une façon suffisante les techniques qu'ils avaient adoptées.

Envisagée à la lumière de populations issues d'une seule plastide, la notion d'espèce se complique de nouveau considérablement. Chaque individu dans une « *éprouvette* » déterminée, a son patrimoine héréditaire, propre, qu'il transmet aux éléments qui en sont issus, suivant des lois imprévisibles d'une façon bien inégale parfois.

Les caractères qui ont servi à définir l'espèce sont la résultante des caractères individuels de chacune des plastides constituant la population. Et cette résultante, n'étant qu'une moyenne, est souvent très éloignée des types extrêmes, qui existent néanmoins dans l'espèce et qui, s'ils étaient isolés, seraient considérés comme des types aberrants, rencontrés en si grand nombre en Bactériologie. Pour n'en citer que quelques-uns mentionnons des Colibacilles sans pouvoir indologène et sans action sur le rouge neutre phéniqué, des germes pyocyanoïdes, etc...

Ces notions étant données, la définition de l'espèce entraînera donc l'étude des caractères du plus grand nombre possible de souches. Chacune d'entre elles devra être issue d'une seule plastide et isolée suivant une technique sûre. Nous renvoyons à ce sujet nos lecteurs à l'ouvrage écrit par MARCHAL en 1932 qui a traité d'une façon détaillée la question de la culture pure en Bactériologie et qui a donné une technique rigoureusement précise pour pouvoir l'obtenir.

Les germes chromogènes bleus ont été fréquemment utilisés comme matériel d'étude pour la variation en Microbiologie.

WASSERZUG (1887), CHARRIN et ROGER (1887), CHARRIN et PHISALIX (1892), CHARRIN et DISSARD (1893), d'ARSONVAL et CHARRIN (1893), BLAISE et SAMBUC (1897), GESSARD (1891-92-98-1901-02-17-19-20-22-25) ont réussi à suspendre temporairement ou à abolir définitivement la fonc-

tion chromogène de *B. pyocyaneus*. ROCHAIX et BANSILLON (1923), au contraire se sont efforcés de faire récupérer à des germes la fonction pyocyanogène qu'ils avaient en partie perdue. DARZINE (1928) a étudié la « *pseudovariabilité* » du Bacille pyocyanique. Nous n'insisterons pas davantage sur ces derniers travaux pas plus que sur ceux d'AOKI (1926) sur la grande plasticité du Bacille pyocyanique. Les résultats obtenus nous paraissent entachés d'erreur. En effet bien qu'il étudie déjà depuis près de vingt ans les Bactéries chromogènes et en particulier le Bacille pyocyanique, LASSEUR n'a jamais observé de faits analogues à ceux décrits par AOKI. Ses examens ont cependant porté non seulement sur les germes de sa collection mais encore sur ceux provenant de nombreuses collections étrangères.

Séduit par les belles particularités de l'espèce chromogène, GESSARD a consacré toute sa vie à l'étude biologique du Bacille pyocyanique. Ce savant après avoir dépouillé l'espèce pyocyanique de tous ses attributs caractéristiques avait obtenu un groupe de germes auxquels il avait donné le nom de « *pyocyanoïdes* ». Il groupait ainsi sous cette appellation des Bactéries ayant gardé la plupart de leurs propriétés originelles, mais ayant perdu la faculté de donner de la pyocyanine.

L'étude de *B. cyanogenus* a permis de même à GESSARD de découvrir trois races dans cette espèce :

1° une race ne produisant que le pigment gris bleu, obtenue comme la race P de *B. pyocyaneus* par transplantations successives sur albumine.

2° une race ne produisant que de la fluorescence, obtenue par réensemencement d'une vieille culture en bouillon ou en gélatine.

3° une race incolore, obtenue par vieillissement prolongé des cultures précédentes ou par leur chauffage à un degré immédiatement voisin de la température amenant la mort du microbe.

De nombreuses modifications, les unes temporaires, les autres héréditaires ont été étudiées par LASSEUR et ses Collaborateurs chez les Bactéries sécrétant un pigment bleu, en même temps qu'un pigment fluorescent. Ces recherches ont le très grand mérite d'avoir eu pour point de départ des cultures ayant pour origine une seule plastide isolée suivant la technique décrite par LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1931), MARCHAL (1932). C'est ainsi que LASSEUR, MARCHAL et A. DUPAIX ont isolé une race uniquement fluorescente chez *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, et une race achromogène qui se sont conservées telles dans leur descendance. Les races nor-

males de *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX possédant à la fois la propriété de sécréter un pigment fluorescent et un pigment bleu, les races uniquement fluorescentes et les races achromogènes se distinguent par leurs caractères cultureux et leurs propriétés biologiques.

Utilisant la même technique MARCHAL (1932) a étudié comparativement les différentes variétés pyocyanogène, érythrogène, mélanogène de l'espèce *B. pyocyaneus*. Partant de cultures ayant pour origine une seule plastide, il a montré qu'il était possible d'obtenir à partir de ces germes des souches présentant des modifications temporaires très nombreuses en relation avec la qualité et la quantité des différents éléments entrant dans la composition des milieux synthétiques sur lesquels ils étaient ensemencés.

Les chromogènes bleus ont donc déjà été abondamment utilisés pour mettre en évidence l'existence de variations chez les Bactéries. Bien des études de ce genre ne paraissent pas cependant dignes d'un très grand intérêt et il serait absolument nécessaire de les renouveler sur des bases plus sûres, en s'efforçant à l'aide de techniques irréprochables de travailler sur des « *lignées pures* ».

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail nous avons rassemblé la documentation concernant les Bactéries bleues et les Bactéries violettes, en même temps que celles donnant à la fois un pigment et une fluorescence.

Nous avons signalé maintes fois dans cet exposé la difficulté qu'il y avait à rapprocher des organismes auxquels on a donné parfois des noms très différents et qui n'ont pas été décrits par les auteurs avec suffisamment de détails.

Il serait nécessaire de reprendre, d'une façon détaillée, l'étude des Bactéries bleues ou violettes encore existantes dans les collections des Laboratoires et *ceci suivant un plan adapté aux exigences actuelles de la Science*: plan que nous n'avons malheureusement pas pu suivre étant donné le peu de renseignements que nous avons rassemblés sur certains germes.

Nous résumerons dans les pages suivantes, les principaux caractères des germes étudiés dans ce travail. Dans cet exposé nous suivrons dans ses grandes lignes l'ordre proposé par THIRY qui, dans un remarquable travail paru en 1900 a distingué chez les Bactéries chromogènes un certain nombre de groupes.

Nous y apporterons quelques modifications en créant des groupes intermédiaires dans lesquels nous rangerons des germes nouveaux.

Nous avons bien tenté en outre de grouper dans un tableau général, tous les caractères morphologiques et culturels des Bactéries étudiées, mais il ne nous a pas été possible d'en tirer parti pour établir des points de comparaison, entre chacune d'elles. Aussi n'avons nous pas jugé utile de publier ce tableau, il n'eût été d'aucun intérêt et n'aurait apporté aucun élément nouveau aux connaissances acquises que nous avons exposées en détail au cours de cet ouvrage et que nous résumons brièvement dans les pages qui suivent.

MICROCOCCLUS CYANEUS (SCHRÖTTER) Cohn 1872

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Cocci petits elliptiques sur gélose et gélatine. Bâtonnets sur pomme de terre.
<i>Fouets.</i>	Immobile, pas de fouets.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Pousse à 15°-20° C.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie.
<i>Odeur.</i>	Odeur fade de colle d'amidon.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Colonies rondes visqueuses.
<i>Gélose.</i>	Pousse lentement.
<i>Pomme de terre.</i>	Mince pellicule visqueuse.

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Culture avec fluorescence verte.
------------------	----------------------------------

PIGMENT	Bleu cobalt.
---------	--------------



BACILLUS CÆLICOLOR Reiner Muller 1908

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Taille du Bacille diphtérique mais plus court. Formes ramifiées. Groupement en V ou en paquet d'épingles comme le Bacille diphté- rique.
<i>Fouets.</i>	Immobile, pas de fouets.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Prend bien le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Pousse de 15° à 36° C. optimum 22°-25° C. (développement et chromogénèse).
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction lente.
<i>Gélose.</i>	Enduit blanc grisâtre contenant de nombreux petits cristaux.
<i>Pomme de terre.</i>	Pigmentation bleu clair envahissant peu à peu tout le tubercule. Après 14 jours, coloration jaune brun sale.

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Trouble uniforme sans voile.
<i>Lait.</i>	Peptisation sans coagulation, coloration bleue tardive jusqu'à 1 cm. en dessous de la surface.
<i>Production d'Indol.</i>	Produit de l'indol.

PIGMENT	Bleu clair.
---------	-------------

BACILLUS LACMUS Schrötter 1889

Origine.

Air.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme.

Cellules cylindriques, 4 μ sur 0 μ 6.

CARACTÈRES DE CULTURE

Pas de caractères décrits par les auteurs.

PIGMENT

Bleu violet pâle.



BACILLUS CÆRULEUS Voges 1893

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bacille de $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 4$ sur $0\ \mu\ 8$ isolé ou courtes chaînettes.
Motilité. Mouvement de translation rapide.
Fouets. Un fouet polaire 3 fois plus long que le Bacille, 2 à 3 spires.
Spores. Pas de spores.
Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Bon développement à 20° C. Développement mais pas de pigment à 37° C.
Aérobiose. Aérobie.
Production d'H₂S Production très faible.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Colonies petites, dimorphisme des colonies, colonies superficielles présentant granulations bleu sombre, bords nets, centre granuleux, aspect en montagne de glace. Le pigment paraît en même temps que la liquéfaction.
Gélose. Enduit gris bleu à 20° C., incolore à 37° C. sans pigment.
Pomme de terre. Culture abondante bleu foncé presque noir à 20° C., pas de production à 37° C.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Voile bleu en 36 heures.
Lait. Couche de crème bleue, pas de coagulation par formation d'acide.

POUVOIR PATHOGÈNE

N'est pas pathogène pour la souris.

PIGMENT

Bleu foncé presque noir.

BACILLUS CÆRULEUS Smith 1887

B. cæruleus SMITH se différencierait de *B. cæruleus* VOGES par des dimensions plus grandes ($2\ \mu$ à $2\ \mu\ 5$ sur $0\ \mu\ 5$), un pouvoir liquéfiant plus lent et une insolubilité dans l'eau et l'alcool de son pigment contrairement à celui de *B. cæruleus* VOGES.

D'autre part SMITH a noté la présence de spores ce que VOGES nie.

BACILLUS PAVONINUS Forster 1899

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Motilité.</i>	Immobile.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction, colonies luisantes, opaques, bleues par transparence.
------------------	--

PIGMENT	Bleu.
---------	-------

BACILLUS INDIGONACEUS Clæssen 1890
(INDIGOBLAUER B.)

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Dimensions identiques au Bacille typhique, bacilles arrondis aux pôles, isolés ou réunis par deux ou trois.
<i>Motilité.</i>	Immobile (les types décrits par VOGES, ZIMMERMANN, MACÉ et CLÆSSEN seraient très mobiles, celui de THIRY serait tantôt mobile, tantôt immobile).
<i>Fouets.</i>	Dépourvu de fouets.
<i>Spores.</i>	Présence de spores allongées.
<i>Capsule.</i>	Une capsule (selon LUSTIG).
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température du Laboratoire.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie stricte.
<i>Production d'H²S</i>	Pas de dégagement.
<i>Production d'Indol</i>	Les avis des auteurs sont partagés.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Colonies identiques à celles du Bacille typhique, pas de liquéfaction.
<i>Gélose.</i>	Culture bleu indigo en 24 heures, devenant violet sombre en 4 jours.
<i>Pomme de terre.</i>	Sur pomme de terre acide, belle culture. Sur pomme de terre alcalinisée, culture peu abondante, vert sale, brillante, humide. Sur pomme de terre glycinée, pigment bleu indigo en quelques jours.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon.

Trouble dans tout le liquide, dépôt gris orange et rouge, voile en surface.

Lait.

Pas de coagulation, coloration bleu verdâtre, pas de peptonisation.

PIGMENT

Bleu indigo.



BACILLE BLEU INDIGO DE LUSTIG 1893

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bacille à extrémités arrondies, dimensions identiques au Bacille typhique. Filaments constitués par deux ou plusieurs plastides.
<i>Motilité.</i>	Mobile.
<i>Capsule.</i>	Présente une capsule (LUSTIG).

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température du laboratoire. À 37° C., ralentissement de la croissance.
---------------------	---

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Pas de liquéfaction, colonies grises devenant bleues.
<i>Gélose.</i>	Colonies bleu indigo devenant violettes au bout de 4 jours.
<i>Pomme de terre.</i>	En 3 jours culture fortement colorée.

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Trouble en 24 ou 48 heures, gros flocons, pas de pigment.
------------------	---

PIGMENT	Bleu indigo.
---------	--------------



BACILLUS INDIGOFERUS Voges 1893

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bacille droit ou légèrement courbé, extrémités coupées nettement, $1\ \mu$ 8 sur $0\ \mu$ 6. Groupés par 2, séparation à la sporulation, éléments isolés cependant.
<i>Coloration.</i>	Bacille coloré de lui-même.
<i>Motilité.</i>	Mouvement de rotation rapide, pouvant persister durant 8 jours.
<i>Fouets.</i>	Un fouet polaire 3 fois plus long que le Bacille lui-même, 2 à 3 tours de spire.
<i>Spores.</i>	Spores allongées.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram. (THIRY a cependant remarqué des éléments à Gram positif et négatif dans une même préparation).

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Pour la chromogénèse et le développement : 20° C. A 37° C. développement sans pigment. Température mortelle 60° C. pendant 10 minutes.
<i>Action</i> <i>sur les nitrates</i>	Réduction en nitrites.
<i>Production</i> <i>d'H²S</i>	Pas de dégagement.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Colonies tachées par nombreux points bleus entourés d'un cercle très net et très sombre, pas de liquéfaction.
<i>Gélose.</i>	Identique à <i>B. indigonaceus</i> , culture gris bleu à bleu foncé.
<i>Pomme de terre.</i>	Enduit bleu vert à reflets métalliques.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Voile en surface trouble léger dans tout le tube
dépôt floconneux grisâtre.

Lait. Pas de coagulation ni de peptonisation, crème
colorée en gris bleu à 20° C.

PIGMENT Violet-bleu.

POUVOIR PATHOGÈNE

Néant.

BACILLE DE GUNTHER ET SPITTA 1891

Origine.

Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme.

Bacille grêle de taille moyenne.

Motilité.

Très mobile.

Fouets.

Un fouet à une extrémité.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. -

Culture bleue.

Gélose.

Culture grise peu colorée en bleu.

PIGMENT

Bleu.

BACTERIUM ROSENBERG B. 1887

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bâtonnet taille moyenne, extrémités arrondies.

Motilité. Mobile.

Spores. Présence de spores.

CARACTÈRES DE CULTURE

Gélatine. Liquéfaction, culture bleue.

Gélose. Culture bleue.

PIGMENT Bleu foncé.



BACILLUS CYANEO-FUSCUS Beijerinck 1899

Origine. Colle forte et fromage, eau et sol.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bâtonnets de longueur variable.

Motilité. Mobile.

Coloration. Les bâtonnets morts sont brun verdâtre à brun noirâtre foncé.

CARACTÈRES DE CULTURE

Aérobiose. Aérobie.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

Gélatine. Liquéfaction avec intensité plus ou moins grande suivant la plus ou moins grande quantité de peptone.

PIGMENT Bleu.



BACILLE BLEU IV DE MACÉ 1898

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bacilles groupés par deux.
<i>Motilité.</i>	Immobile.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	±.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction faible.
<i>Gélose.</i>	Colonies à centre gris bleu.

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Collerette bleuâtre, développement dans toute la masse.
<i>Lait tournesolé.</i>	Virage au rouge.

PIGMENT	Violet.
---------	---------



BACILLUS VISCOFUCATUS
CHROMOBACTERIUM VISCO-FUCATUM

Harrison et Barlow 1905 (Bergey 1923)

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bacille cylindrique, incurvé ordinairement, parfois droit, extrémités arrondies, $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 5$ sur $0\ \mu\ 9$.
Isolé ou en chaînes de 3 à 5 éléments.

Fouets. Immobile, pas de fouets.

Spores. Pas de spores.

Colorabilité. Prend le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. De 0° à 39° C. (ne pousse plus à cette dernière température) optimum 20° C.
Température mortelle : 65° C. pendant 10 minutes.

Aérobiose. Aérobie.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélat. + hydrate
de carbone. Liquéfaction.

Gélose. Croissance lente, pas de pigment en 18 jours.

MILIEUX LIQUIDES

Lait. Au bout de 15 jours, peptonisation complète.

PIGMENT Violet.



BACILLUS POLYCHROMOGENES Chamot et Thiry 1900

Origine. Eau de puits.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Variable, germe court à extrémités arrondies présentant éléments sphériques; bâtonnets longs à bouts renflés rectilignes ou courbes. Groupement en diplobacilles ou en chainettes.

Coloration. Coloré parfois en rouge ou en bleu uniformément ou bien présentant grains intrabacillaires sans ordre régulier, bleu foncé.

Motilité. Lentement mobile ou tout à fait immobile.

Capsule. Capsule chez les formes rondes.

Colorabilité. Prend le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Donne plus belles colorations vers 12°-15° C.

Aérobiose. Aérobie; développement faible dans atmosphère sans oxygène, mais sans coloration.

Production d'Indol. Pas de production.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Energique liquéfaction.

Sérum solidifié. Liquéfaction rapide.

Artichaut. Verdissement très rapide du substratum.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Trouble uniforme, léger anneau violet en surface très rarement.

Lait. Peptonisation totale en 8 jours; liquide rousâtre.

FIGMENT Gris-bleu à bleu indigo.

BACILLUS VIOLACEUS Macé 1888

Origine. * Eaux et liquides en putréfaction.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnets de 2 μ à 3 μ sur 0 μ 4 à 0 μ 5.
<i>Motilité.</i>	Immobile ou lentement mobile dans les liquides.
<i>Fouets.</i>	Pas de fouets à la température ordinaire.
<i>Spores.</i>	Spores légèrement elliptiques dans les milieux de culture. Sont médianes.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram. Ni acido, ni alcool résistant.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Assez sensible à la chaleur. Température mortelle: une minute, à 55° C.: destruction de 80 % des plastides.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie.
<i>Production</i> <i>d'Indol.</i>	Ne donne pas d'indol.
<i>Action</i> <i>sur les nitrates.</i>	Ne réduit pas les nitrates.
<i>Odeur.</i>	Acide butyrique.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction brusque.
<i>Gélose.</i>	Culture épaisse et plissée violet noir.
<i>Pomme de terre.</i>	Culture très lente.

PIGMENT Violet.

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM (BERGONZONI)

Comitee S. A. B. 1920

Origine.

Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme.

Bâtonnets grêles, 0 μ 8 à 1 μ sur 2 μ à 5 μ ,
isolés ou en chaînettes.

Motilité.

Mobile.

Fouets.

Péritriches.

Colorabilité.

Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température.

Optimum: 25°-30° C.

Aérobiose.

Aérobic.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine.

Colonies rondes, grises, coloration violette dans
la région centrale, liquéfaction en entonnoir.

Gélose.

Colonies blanchâtres devenant violettes.

Pomme de terre.

Culture violet foncé.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon.

Trouble avec formation, anneau violet.

Lait tournesolé.

Pellicule violette, peptonisation, alcalinisation.

PIGMENT

Violet.

BACILLUS VIOLACEUS LAURENTIUS Jordan 1890

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnets groupés par 2, par 4 ou 5. Extrémités arrondies, $3\ \mu$ à $3\ \mu\ 6$ sur $0\ \mu\ 6$.
<i>Motilité.</i>	Très mobile.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Colonies superficielles croûteuses violettes, colonies profondes granuleuses.
------------------	---

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Développement faible.
<i>Bouillon nitrate de potasse.</i>	Développement plus riche, coloration violette.
<i>Lait.</i>	Coagulation, coloration violette.

PIGMENT	Violet.
---------	---------



BACILLUS VIOLARIUS ACETONICUS Bréaudat 1906

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bacille court, épais 3 μ sur 1 μ .
<i>Fouets.</i>	Pas mis en évidence.
<i>Motilité.</i>	Mouvement d'oscillation rapide.
<i>Spores.</i>	Vers le 6 ^e jour de culture.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Se développe de 30° à 37° C.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie facultatif.
<i>Action</i> <i>sur les nitrates.</i>	Réduit nitrates en nitrites.
<i>Acétone.</i>	Production d'acétone, formation empêchée par ammoniacque.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

<i>Gélose.</i>	Se développe bien.
<i>Lait.</i>	Coagulation puis peptonisation.

PIGMENT	Violet intense.
---------	-----------------



BACTERIUM CRISTALLINO VIOLACEUM

Sp. Nov. Cholkevitch

Origine. Isolé d'un morceau de tourbe.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Germe à extrémités arrondies, dimensions variables suivant le milieu : 3 μ 25 à 2 μ 25 de longueur sur milieu liquide ; 1 μ 5 sur 0 μ 75 à 0 μ 37 sur milieu solide.

Motilité. Mobile dans les cultures jeunes.

Spores. Pas de spores.

Capsule. Grosse capsule visible sans coloration.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

L'auteur ne donne aucun caractère de culture.

FIGMENT Violet.



BACILLUS JANTHINUS (ZOPF) Flügge 1886

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnets de $1\ \mu$ 5 à $3\ \mu$ 5 sur $0\ \mu$ 6, extrémités arrondies.
<i>Motilité.</i>	Mouvement de rotation sur lui-même.
<i>Fouets.</i>	Pas de fouets.
<i>Spores.</i>	Absence de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température optima de culture 15° C.
<i>Aérobiosè.</i>	Aérobie facultatif.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction lente (seulement les colonies de surface).
<i>Pomme de terre.</i>	Bon développement.

PIGMENT	Violet foncé.
---------	---------------



BACILLUS LIVIDUS Plagge et Proskauer 1887

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnets de 1 μ 5 à 4 μ 7, bouts arrondis.
<i>Motilité.</i>	Peu mobiles.
<i>Fouets.</i>	Pas de fouets.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température ordinaire.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie facultatif.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction faible.
<i>Gélose.</i>	Croissance lente.
<i>Pomme de terre.</i>	Culture luisante visqueuse

PIGMENT Bleu violet.

BACILLUS MEMBRANACEUS AMETHYSTINUS

Eisenberg 1891

Origine. Eau de puits.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bâtonnets courts à bouts arrondis $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 4$
sur $0\ \mu\ 5$ à $0\ \mu\ 8$.
Motilité. Immobile.
Spores. Absence de spores (pas prouvé, d'après EISEN-
BERG).
Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Se développe vers 15° - 20° C., pas à 37° C.
Aérobiose. Anaérobie facultatif.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Liquéfaction.
Gélose. Colonies blanches devenant violettes dès le 8^e
jour. Eclat métallique au bout d'un mois.
Pomme de terre. Culture lente.

PIGMENT Bleu violet.

POUVOIR PATHOGÈNE

Hypothermisant.

B. MEMBRANACEUS AMETHYSTHIMUS I 1913

B. MEMBRANACEUS AMETHYSTHIMUS II Bampton 1913 (1)

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bacille 1 μ 4 à 3 μ 5 isolé ou courtes chainettes.	Bacille 1 μ 4 à 3 μ 5 extrémités arron- dies.
<i>Motilité.</i>	mobile.	mobile.
<i>Fouets.</i>	fouets péritriches.	fouets péritriches.
<i>Colorabilité.</i>	ne prend pas le Gram.	ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	optimum 37°,5.	optimum 30° C.
<i>Aérobiose.</i>	aérobie.	aérobie.
<i>Production</i>		
<i>d'Indol.</i>	ne donne pas d'indol.	ne donne pas d'indol.
<i>Action</i>		
<i>sur les nitrates.</i>	ne réduit pas les ni- trates.	ne réduit pas les ni- trates.
<i>Dextrose et</i>		
<i>maltose.</i>	sont attaqués.	attaqués.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

<i>Gélatine.</i>	colonies blanc bleuâ- tre, liquéfaction lente.	colonies pâles bleuâ- tres, violettes en profondeur.
<i>Gélose.</i>	colonies blanc jaunâ- tre violet pâle.	colonies violet pâle.
<i>Pomme de terre.</i>	trouble, pellicule bleu pâle.	masse brun jaunâtre.
<i>Bouillon.</i>	alcalinisation puis peptonisation.	trouble, pellicule vio- lette.
<i>Lait tournesolé.</i>	culture brune à vio- lette.	alcalinisation puis peptonisation.

PIGMENT	violet.	violet.
---------	---------	---------

(1) Voir note de l'auteur, page 101.

BACILLE VIOLET PATHOGÈNE DE GAUDUCHEAU 1907

Origine. Eau de puits.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bacilles souvent incurvés de 1 μ à 3 μ .

Motilité. Mobile.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Se développe bien au-dessus de 20° C. Température mortelle: 15 minutes à 56° C.

Odeur. Rappelant odeur amende amère.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Liquéfaction.

MILIEUX LIQUIDES

Lait. Coagulation et peptonisation.

PIGMENT Violet.

POUVOIR PATHOGÈNE

Hypothermisant considérable.

BACILLUS PYOCYANEUS Gessard 1882

Origine. Eau, air, sol.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bacille dont la longueur varie suivant le milieu.
Rapport $\frac{L}{I}$ de LASSEUR: varie entre 2 μ 4 et 9 μ 6.
Motilité. Mobile.
Fouets. 1 fouet polaire quelle que soit variété, longueur fouet varie de 5 μ à 7 μ suivant les espèces sauf chez *B. pyocyaneus melanogenes* où elle atteint 12 μ .
Spores. Pas de spores.
Colorabilité. Ne prend pas le Gram.
Se décolore en 10 secondes.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Se développe de 15° à 43° C. Température mortelle: 5 minutes à 59° C.
Aérobiose. Anaérobie facultatif.
Odeur. de coumarine.
Action
sur les nitrates. Réduit les nitrates en nitrites, puis en azote.
Action
sur les sucres. Variable suivant le nombre d'atomes de carbone et suivant l'espèce considérée.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Pouvoir protéolytique intense sauf chez variété mélanogène où il est très faible.
Gélose. Culture grisâtre, glaireuse, milieu avec fluorescence verte très nette.
Pomme de terre. Culture épaisse.
Pomme de terre
glycérinée. Pigment vert bleu intense (caméléonage).

Albumines

animales. Pouvoir protéolytique intense.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Trouble uniforme en 24 heures, voile, pigmentation verte passant au vert foncé, puis brunissement.

Lait. Coagulation plus ou moins rapide suivie d'une peptonisation plus ou moins rapide (présure).

AUTRES CARACTÈRES

Antagonisme. Possède un pouvoir antagoniste vis-à-vis de nombreux germes.

*Réaction
à l'égard des
sérum.* Ne permet pas d'obtenir des sérums très actifs. Le sérum antiprotéasique de LAUNOY permettrait cependant le diagnostic de l'espèce pyocyanique.

*Stabilité des
suspensions sous
l'action des ions.* Toutes les variétés ne sont pas précipitables par les ions à charge triple (Fe + + + et Al + + +).

PIGMENT Fluorescence, pyocyanine, pigment rouge, pigment noir.

POUVOIR PATHOGÈNE

Agent des plaies, rare à l'heure actuelle.
Souvent virulent d'emblée, pouvant être exalté par passage sur les animaux.

BACILLUS JASMINO CYANEUS Klinger 1903

Origine. Isolé de la bile.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnet.
<i>Motilité.</i>	Mobile.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Production</i>	
<i>d'Indol.</i>	Pas de production.
<i>Odeur.</i>	Jasmin.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction rapide, coloration bleue.
<i>Lait.</i>	Coagulation et peptonisation.
<i>Milieux sucrés</i> (lactose, glu- cose).	Pas de dégagement gazeux.

PIGMENT Bleu.

POUVOIR PATHOGÈNE

Pathogène pour la souris et le cobaye.

BACILLUS SYNCYANEUS EHRENBERG 1840

Origine. Lait.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Bacille de 2 μ à 4 μ sur 0 μ 5, extrémités arrondies.
Motilité. Lentement mobile.
Fouets. 1 seul fouet présentant 2 à 4 spires de 3 μ à 9 μ de long (LASSEUR).
Spores. Spores ovoïdes donnant aux bâtonnets l'aspect d'une massue, spores terminales ou médianes.
Colorabilité. Prend le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température. Se développe à la température ordinaire et pas 40° C. Température mortelle : quelques minutes à 60° C.
Aérobiose. Aérobie.
Production d'indol. Production.
Production d'ammoniaque. Production.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Pas de liquéfaction, colonies en gouttelettes muqueuses. Selon WOLF liquéfaction au bout de plusieurs semaines.
Gélatine bouillon. Fluorescence.
Gélose. Couche grise.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Dépôt épais blanc sale, trouble intense dans tout le tube, liquide verdâtre.
Lait. Pas de coagulation.

PIGMENT Fluorescent et bleu.

POUVOIR PATHOGÈNE

Inoffensif pour l'homme et les animaux.

BACILLUS CYANEO-FLUORESCENS Zangemeister 1895

Origine.

Lait.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme.

Germe ovale court et épais de 2 μ sur 1 μ .

Motilité.

Très mobile.

Fouets.

1 à 3 fouets polaires, les plastides à 2 fouets sont plus nombreuses, 2 à 3 spires, 3 μ à 6 μ de long.

Colorabilité.

Prend le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

Température.

Température du laboratoire, développement plus rapide à 25° C.

Résistance.

Peut se conserver pendant longtemps.

Odeur.

de triméthylamine.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélose.

Pas de liquéfaction, colonies rondes blanchâtres, bords nets et irréguliers.

Gélatine.

Culture grise.

Pomme de terre.

Croît assez bien, enduit brun noir.

MILIEUX LIQUIDES

Lait stérilisé.

Aucun changement même après addition d'acide.

*Lait non stérilisé
conservé dans
un endr. frais
et humide.*

Coagulation présentant faible teinte.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Sur milieu L1.

Fluorescence verte.

Sur milieu L2.

Pigment bleu violet.

PIGMENT

Fluorescence et pigment bleu.

BACILLUS LE MONNIERI Lasseur 1912

Origine. Eaux.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnets droits ou très légèrement incurvés, extrémités arrondies, 2 μ sur 0 μ 5, isolés ou en diplobacilles, courtes chaînettes de 3 ou 4 éléments.
<i>Motilité.</i>	Motilité variable suivant le milieu, mouvements de rotation et de translation.
<i>Fouets.</i>	70 % des plastides sont monotriches. 30 % ont 2 fouets de longueur variant entre 3 μ et 5 μ 5.
<i>Spores.</i>	Pas de spores.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température mortelle: 10 minutes à 52° C.
<i>Production d'indol.</i>	Ne donne pas d'indol.
<i>Action sur les nitrates.</i>	Transformation des nitrates en nitrites puis en azote.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

<i>Gélatine.</i>	Partie centrale bleue, zone granuleuse jaune verdâtre, puis zone liquéfiée incolore et zone de gélatine colorée en vert.
<i>Pomme de terre.</i>	3 ^e ou 4 ^e jour coloration bleu de Prusse à aspect métallique, tubercule rouge vineux ou violacé superficiel.
<i>Artichaut.</i>	Sécrétion du pigment bleu et verdissement du substratum.
<i>Albumines animales.</i>	Ni coloration ni liquéfaction.

MILIEUX LIQUIDES

<i>Bouillon.</i>	Trouble en 24 heures, pellicule en surface, pas de pigment.
<i>Lait.</i>	Peptonisation sans coagulation préalable.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

<i>Sur milieu L2.</i>	A 20°-25° C. après 3 jours voile bleu à la surface du liquide, en dessous zone colorée en rouge violet, puis en dessous jaune vert.
-----------------------	---

AGGLUTINATION Donne des sérums actifs au 1/2.000.

PIGMENT Bleu, rouge violet, jaune vert.



BACILLUS CARYOCYANEUS Beijerinck-Dupaix 1930

Origine. Bois pourri.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Forme. Plastides parfois ovales, le plus souvent en bâtonnets.
Fouets. 1 fouet polaire.
Spores. Pas de spores.
Colorabilité. Ne prend pas le Gram, se décolore en 5 secondes.

CARACTÈRES DE CULTURE

Odeur. Odeur putride.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

MILIEUX SOLIDES

Gélatine. Liquéfaction.
Pomme de terre glycérinée. Le tubercule est entièrement recouvert d'un enduit bleu vert très foncé devenant noir cirage.

MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. Trouble intense, voile grimpant irisé plissé, fluorescence verte intense.
Lait. Pas de coagulation, peptonisation, anneau noir, sur toute la hauteur de la colonne liquide stratification régulière de zones de coloration dégradée (gris bleu, bleu ardoise, bleu vert).

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Sur milieu L1. Fluorescence verte, pigment bleu devenant violet puis noir.
Sur milieu L2, Pigment bleu violet.

AGGLUTINATION

*Dilution limite
d'agglutination
en présence de
sérum B. Ca-
ryocyaneus.* 1/100.000.

PIGMENT

Fluorescence verte, pigment bleu intense, violet rouge, noir.

POUVOIR PATHOGÈNE

Ne détermine aucun trouble appréciable chez le lapin, cobaye, souris blanche, grenouille.
Pouvoir pathogène indéniable pour les larves de *Galleria mellonella*.

BACILLE BLEU DE MILDENBERG 1922

Origine. Air.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

<i>Forme.</i>	Bâtonnet épais, court, ovale à peine plus long que large.
<i>Motilité.</i>	Mobile.
<i>Fouets.</i>	Un ou plusieurs fouets unipolaires.
<i>Spores.</i>	N'ont pu être mises en évidence dans cultures de 4 jours.
<i>Colorabilité.</i>	Ne prend pas le Gram.

CARACTÈRES DE CULTURE

<i>Température.</i>	Température ordinaire plus favorable, se développe au-dessus et au-dessous cependant.
<i>Aérobiose.</i>	Aérobie.

CARACTÈRES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU

<i>Gélatine.</i>	Liquéfaction.
<i>Lait</i> <i>non stérilisé.</i>	Coagulation en 2 jours sans pigment.
<i>Lait stérilisé.</i>	Coagulation partielle, pas de pigment.
<i>Lait écrémé</i> <i>stérilisé.</i>	Pas de coagulation.

PIGMENT	Bleu, fluorescence.
---------	---------------------

POUVOIR PATHOGÈNE

Pas pathogène pour le lapin, cobaye, souris blanche.

Après avoir examiné les Bactéries bleues et violettes et les germes s'en rapprochant nous avons étudié deux germes : *B. mesentericus fuscus* et *B. mesentericus niger* qui sont capables de donner des pigments rouge violet sur les milieux synthétiques.

A ce sujet on sait en effet que LASSEUR et THIRY avaient montré que sur des milieux synthétiques de composition parfaitement connue, des germes considérés comme achromogènes étaient susceptibles de manifester un pouvoir chromogène.

Nous avons consacré la deuxième partie de ce travail à l'étude des pigments.

Nous avons étudié successivement leur siège, les procédés permettant leur identification tels que : l'analyse capillaire, l'établissement des spectres d'absorption.

Après avoir souligné les causes d'erreurs inhérentes à de telles déterminations nous avons montré que les pigments bactériens avaient déjà suscité de très nombreuses recherches permettant d'attribuer à certains d'entre eux une formule chimique.

Au cours de ce chapitre nous avons mentionné l'influence de quelques facteurs sur la chromogénèse bactérienne tels que les agents physiques (température, lumière, milieu). Quelques pages rappellent brièvement l'action sur la chromogénèse de quelques éléments entrant dans la composition des milieux synthétiques (fer, magnésium, phosphore, calcium, aliments azotés et carbonés).

L'influence de la semence dans la production du pigment n'a pas été oubliée avant d'examiner quel est le rôle des pigments bactériens qui peuvent être considérés comme des oxydo-réducteurs.

Dans un deuxième chapitre nous avons rapproché quelques-uns des pigments plus particulièrement bien étudiés par THIRY, LASSEUR, GIRARDET et A. DUPAIX.

Nous avons terminé cette étude en envisageant la question de la classification en Bactériologie. Nous avons montré combien il était difficile de classer les Bactéries bleues et violettes et combien il serait nécessaire de reprendre une telle étude en donnant plus d'importance à des caractères trop souvent négligés par les auteurs : tels sont la parenté sérologique, l'étude spectrographique et microchimique du pigment, la stabilité des suspensions bactériennes sous l'influence des ions, la modification de la perméabilité de la membrane sous l'action de nombreux facteurs.

Néanmoins en envisageant l'action des acides et des bases sur les pigments bactériens comme le faisaient les anciens Bactériologistes, il est possible de noter des divergences assez grandes dans leur façon de réagir vis-à-vis de ces substances. C'est ce qui résulte du tableau suivant que nous empruntons à A. DUPAIX.

*Action des acides et des bases
sur les pigments sécrétés par quelques germes bleus.*

DÉSIGNATION des Bactéries	COLORATION du Pigment	COLORATION DES SOLUTIONS du Pigment après addition de	
		acide, puis base	base, puis acide
<i>M. cyaneus</i> (SCHRÖTTER)	bleu cobalt	rouge → bleu	
<i>M. pseudo-cyaneus</i> (CORN)	bleu bleu-vert	rouge → bleu	
<i>B. cyanogenus</i>	bleu	bleu → rouge	rouge → bleu
<i>B. pyocyaneus</i>	bleu	rouge → bleu	bleu → rouge
<i>B. indigoferus</i>	bleu	bleu → décoloré	
<i>B. polychromogenes</i> }	bleu	violet ou rouge	violet
	vert	rouge; excès d'acide, décoloré	vert → rouge
<i>B. lacmus</i>	bleu-violet pâle	rose-rouge	bleu

Envisageant la variation et la dissociation en Bactériologie, nous avons souligné combien pour effectuer de telles études il était nécessaire de prendre de grandes précautions, la plastide bactérienne, comme tout organisme vivant, étant susceptible de modifications, du fait même qu'elle vit.

ADDENDUM

LASSEUR et ses Collaborateurs ont résumé, en 1931, les recherches effectuées sur la fluorescence des cultures bactériennes, mais, depuis cette époque la Microbiologie s'est enrichie de données extrêmement précieuses dues à Ch. DHÉRÉ (1933), Ch. DHÉRÉ, S. GLUCKSMANN et L. RAPETTI (1933).

Nous ne pouvons, dans un travail limité aux Bactéries bleues, donner un aperçu d'ensemble sur l'œuvre fondamentale du savant Professeur de Fribourg (Suisse). Cependant, il faut bien reconnaître que celui qui n'a pas vu les spectres d'absorption et les spectres de fluorescence de la « *bonelline* » publiés par DHÉRÉ et FONTAINE (1932), celui-là, disons-nous, ne peut se faire une idée même approchée, de la précision obtenue par DHÉRÉ et ses Collaborateurs, ni concevoir toutes les possibilités ouvertes en Microbiologie par les travaux de la célèbre Ecole de Fribourg.

Dans une mise au point de 309 pages, publiée dans « *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden* » (1933), DHÉRÉ résume nos connaissances sur la fluorescence en Biologie. Ici, nous rappellerons seulement les expériences effectuées sur la pyocyanine qui, par sa réduction, montre de magnifiques fluorescences vertes. Le savant Professeur de Fribourg estime que le meilleur procédé pour mettre en évidence la fluorescence verte de la pyocyanine à la lumière naturelle, consiste à réduire le chlorhydrate de pyocyanine par l'hydrosulfite; on ajoute ensuite de l'alcool méthylique et on agite très doucement. « *Presque tout le pigment passe dans la couche supérieure, mais la solution aqueuse, à peine colorée, présente une forte fluorescence verte quand on la place dans un faisceau convergent de rayons solaires.* »

Vu et bon à imprimer :

Nancy, le 10 avril 1934.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy,

P. SEYOT.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 12 avril 1934.

Le Recteur de l'Académie de Nancy,

Président du Conseil de l'Université.

L. BRUNTZ.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMETZ (Léopold). — (Hochschule für Bodencultur in Wien). Die Bakterien der Trink und Nutzwasser. Mittheilungen der Vervuchstation für Brauerei und Moelzerei in Wien, 1888. C. Reisser und Werthmer, p. 48, n° 77, B. violaceus Taf, IV et V, p. 43, n° 20, M. cyaneus, p. 19.
- ADAMETZ (Léopold). — Untersuchungen über die Niederen pilze der Ackerkrume. In *Diss. philosoph. Facultaet.*, Leipzig, 1886. Baer und Germann, p. 80, 2 Taf.
- AGER (G.). — A peculiar chromatogenic Bacillus. *New-York med. Journal*, 1894, p. 265.
- AGULTON et ROBERT (Th.). — Action de l'uranium colloïdal sur le bacille pyocyannique. *C. R. de l'Académie des Sciences*, Paris, 1914, VIII, p. 349.
- ALMQUIST (Ernst), Stockholm. — Ueber eine methode, das specifische Gewicht von Bakterien und anderen Koerperchen zu bestimmen. *Zeot. f. Hygiene*, 28 Bd, p. 320, 1898.
- ARCHER. — A black micrococcus. *Quartely journal of microscop. Sc.*, 1874, p. 321.
- d'ARSONVAL et CHARRIN. — Action de divers agents (pression ozone) sur les Bactéries. *C. R. Société de Biol.*, t. 45, p. 1028, 1893.
- d'ARSONVAL et CHARRIN. — Relations entre les fonctions chromogène, pathogène, antifermentative du Bacille pyocyannique. *C. R. Société de Biol.*, t. 45, p. 237, 1893.
- ARTAULT (Stephen). — Recherches bactériologiques, mycologiques, zoologiques et médicales sur l'œuf de poule et ses agents d'infection. Paris, Ollier Henry, p. 328, 1893.
- ARTAULT (Stephen). — Flore et faune des cavernes pulmonaires. *Arch. de Parasitologie*, t. 1, n° 2, p. 127, 1898.
- AUBEL (E.) et COLIN (H.). — Action des sucres sur la fonction pigmentaire du bacille pyocyannique. *C. R. Soc. de Biol.*, Paris, t. 75, p. 25, 1913.
- AUBEL (E.) et COLIN (H.). — Nature de l'aliment azoté et production de pyocyanine par le bacille pyocyannique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 74, p. 790, 1913.
- AUBEL (E.). — Action du bacille pyocyannique sur l'asparagine. *C. R. Acad. des Sciences*, t. 173, p. 179, 1921.
- AUBEL (E.). — Attaque du glucose et du levulose par le bacille pyocyannique. *C. R. Acad. des Sciences*, t. 13, p. 1493, 1921.
- BABES. — Notes sur quelques matières colorantes et aromatiques produites par le bacille pyocyannique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 1, 9^e série, p. 438, 1889.

- BAMPTON (J.). — Sur le violaceus et le Membranaceus amethystinus. *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, 71, p. 129, 1913.
- BEGUET. — Hypothèse sur le rôle de la pression osmotique dans les phénomènes microbiens. I. Phénomène de d'Herelle. II. Variations et mutations des types microbiens. *Arch. Inst. Pasteur de l'Afrique du Nord*, 5, p. 25, 1927.
- BEIJERINCK. — La biologie d'une Bactérie pigmentaire. *Arch. Néerlandaises des sciences exactes et naturelles*, t. XXV, p. 227, 1891.
- BEIJERINCK. — Die Lebensgeschichte einer Pigment bacterie. *Botanische Zeitung*, p. 705, 1891.
- BEIJERINCK. — Mutationen bei Mikroben. *Folio Microbiologica*, 1912 (Delft).
- BERGONZINI. — Sopra in nuovo bacterio colorato. *Annuario d. Soc. de Natur. die Modena Ann.*, 14 fasc., 2 Gen., p. 18, 1880.
- BERNHARDT. — Ueber Variabilitat Pathogener Bakterien. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.* Bd. 79, s. 175, 1915.
- BEYERINCK (M.-W.). — Ueber Chinonbildung durch Streptothrix chromogena und Lebensweise dieses Microben. *C. F. Bakt.*, 1900, 2 Abt., VII Bd., p. 9-12.
- BIEL (Wilhelm). — Ueber einen Schwarze Pigment bildeten Kartoffel-bacillus. *Kiel. med. in. Diss.*, 11 mars 1896, 8 p., Fischer, Iéna.
- BIEL (Wilhelm). — *Orig. c. f. Bakt.*, 1896, II Bd., p. 137, 2 Abt.
- BLAISE et SAMBUC. — De l'action des rayons X sur le pyocyaneus et la Bactérie charbonneuse. *C. R. Soc. Biol.*, t. 49, p. 689, 1897.
- BLANC (J.). — Transformation de Bacilles pyocyaniques en Bacilles sans pigments. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, p. 52, 1923.
- BLANCHARD (R.). — In *Traité de Pathologie générale*. Ch. Bouchard-Masson. II., p. 854, Nocardia violacea.
- BODIN. — Les Bactéries de l'eau, de l'air et du sol. Paris, 1905.
- BOLAND (G.-W.). — Ueber Pyocyanin der blauer Farbstoff des Bacillus pyocyaneus. *Centralbl. F. Bakt. Orig.*, B. XXV, p. 897, 1899.
- BORDET et SLEESWYK. — Serodiagnostic et Variabilité des microbes selon le milieu de culture. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 24, p. 476, 1910.
- BORDET. — Influence du calcium sur les caractères des espèces microbiennes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 45, p. 26, 1930.
- BORDET (J.) et RENAUX (E.). — L'influence du calcium sur l'évolution des cultures de charbon. *Ann. Inst. Pasteur*, p. 1, 1930.
- BORTELS (H.). — Ueber die Betendung von Eisen, Zinck und Kupfer fur mikroorganismen. *Biochemischezeitschr.* 182 Bd, Heft 56, p. 346, 1927.
- BOTEZ (M.-A.). — Bacille fluorescent liquéfiant pathogène pour l'homme et les animaux. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, t. 79, p. 89, 1916.
- BOUTARIC. — Les colloïdes et l'état colloïdal. Alcan, Paris, 1931.
- BOYCE RUBERT (W.) et HILL (Ch.-A.). — A classification of the microorganisms found in water. *Journal of Pathol. and Bact.*, mai 1899, p. 32.
- BOWHILL (Thomas). — *Manual of bacteriological Technique and special Bacteriology*, 1899, Oliver et Boyd, Edinburgh.
- BRACONNOT (Henri). — Observations sur le lait bleu. *Journal de Chimie médicale de Pharmacie et de Toxicologie*, t. II, 2^e série, p. 625, 1836.

- BREAUDAT. — Sur un microbe nouveau producteur d'acétone. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 20, p. 874, 1906.
- BREVILLE (R.). — Les eaux potables. Procédés actuels d'appréciation de leur valeur hygiénique, Baillière, p. 100, 1897.
- BROQUIN LACOMBE (A.). — Sur un pigment bleu du *Bacillus mesentericus niger*. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, t. 74, p. 331, 1913.
- BROQUIN LACOMBE (A.). — Sur un caractère différentiel entre *Bacillus mesentericus niger* et *Bacillus lactis niger*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 25, p. 598, 1913.
- BUJWID (O.) (Varsovie). — Sur les Bactéries trouvées dans la grêle. *Ann. Inst. Pasteur*, t. I, p. 592, 1887.
- BUJWID (O.). — Die Bakterien in Hagelkoernern. Orig.: *C. F. Bakt.*, III Bd., p. 1, 1888.
- BURGE (W.-E.) et NEILL (A.-J.). — Les degrés comparés auxquels les bactéries fluorescentes et non fluorescentes sont tuées par l'influence des rayons ultra-violet. *The American Journal of Physiology*, Baltimore, t. 38, p. 400, 1915.
- BURNET. — Action d'entraînement entre races et espèces microbiennes. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, t. 14, p. 384, 1925.
- BUTSCHLI. — II. Weitere Ausfuehrungen über den Blau Cyanophyceen und Bakterien. Leipzig, 1896.
- CAMPANA. — La crisarobina sopra alcuni fermenti e sopra alcuni schizomyceti patogeni. *La riforma medica*, VI, n° 116, p. 693.
- CHAMOT (E.-M.) et THIRY (G.). — Le pigment du *B. polychrome*. Cultures spectre. *Réunion biologique de Nancy*, février 1897.
- CHAMOT (E.-M.) et THIRY (G.). — Studies on Chromogenic Bacteria I. Notes on the Pigment of *Bacillus polychromogenes*. *The Botanical Gazette*, vol. 30, décembre 1900.
- CHARRIN et ROGER. — Des modifications que l'on peut provoquer dans les fonctions d'un germe chromogène. *C. R. Soc. Biol.*, t. 4, p. 596, 1887.
- CHARRIN et PHISALIX. — Abolition persistante de la fonction chromogène du *B. pyocyaneus*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 44, p. 577, 1892.
- CHARRIN et DISSARD (A.). — Les propriétés du bacille pyocyanogène en fonction des qualités nutritives du milieu. *Mémoire de la Soc. Biol.*, t. 45, p. 183, 1893.
- CHARRIN. — Variations bactériennes. Atténuation. *Semaine médicale*, 1895.
- CHARRIN et DE NITTIS. — Un *Bacillus subtilis* pathogène. *C. R. Soc. Biol.*, juillet 1897.
- CHARRIN et DE NITTIS. — Sur la production simultanée des pigments noirs bleus verts et jaunes par Bacille pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.*, juillet 1898.
- CHARRIN et DESGREZ. — Production d'une substance mucinoïde par les Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. 50, p. 209, 1898.
- CHURCHMAN (John). — L'action du violet de gentiane sur les enzymes, les toxines et les infections ultra-microscopiques. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New-York, vol. II, p. 54, 1913.

- CHURCHMAN (John). — L'action des réinoculations répétées de l'agar du violet de gentiane sur les organismes positifs de gentiane. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 18, p. 20, 1920.
- CHURCHMAN (John). — La cause du parallélisme entre la réaction de Gram et la réaction du violet de gentiane. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 18, p. 17, 1920.
- CLAESSEN (Heinr.). — Ueber einem indigoblauen Farbstoff erzeugenden Bacillus aus Wasser. *C. f. Bak.* VII Bd., p. 13, 1890.
- CLARK (W.), MANSFIELD. — The determination of hydrogen ions. *Seconde édition*, Baltimore, Williams et Wilkins, 1923.
- CLUZET (J.) et ROCHAIX (A.). — Contribution à l'étude spectrophotographique des pigments du bacille pyocyanique. *Journal de Physiol. et de Pathol. génér.*, Paris, t. 29, p. 378, 1921.
- COHN (Ferdinand). — Untersuchungen über Bakterien. *Beitrag zur Biologie der Pflanzen*, 1 Bd. 2 H., p. 127, 1870.
- COMBERG (M.). — Sur la cause de la variabilité des Bactéries anaérobies (d'après Gram). *Centralb. für Bakt.*, Jéna, Orig., 88, p. 423. 1922.
- CORDIER RAJAT et PEJU. — Influence de la lumière blanche diffuse et diverses radiations sur la fonction chromogène du Micrococcus prodigiosus. *C. R. Soc. Biol.*, t. 65, p. 376, 1908.
- CORDIER RAJAT et PEJU. — Cultures achromogènes de Micrococcus prodigiosus en présence de liquides à haute tension de vapeur. *C. R. Soc. Biol.*, t. 65, p. 344, 1908.
- CORNIL (A.-V.) et BABES. — Les Bactéries I et II, 1890, Alcan.
- COUDRAY. — Contribution à l'étude de la coloration de Gram. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1929.
- COURMONT (J.). — *Précis de Bactériologie pratique*. Doin, p. 195, 1897.
- DEELENAN (Marinus). — Der einfluss der reaction des Naehrbodens auf das Bakterien wachstum. *Arbeit aus dem K. Gesundheitsamte*, 1897, 13 Bd., p. 374.
- DELANOE. — Notes sur la biologie du Bacillus prodigiosus. Influence de la température sur la végétation et le pouvoir chromogène. *C. R. Soc. Biol.*, t. 60, p. 674, 1906.
- DHERE. — L'étude spectroscopique et spectrographique des fluorescences biologiques. Sa réalisation pratique. Avantages de la spectrographie. *Ann. de Physiol. et de Physicochimie biologique*, t. VIII, n° 4, 1932.
- DHÉRÉ (Ch.). — Nachweis der biologisch wichtigen Körper durch Fluoreszenz- und Fluoreszenzspektren. *Handb. biologisch. Arbeitsmethoden Em. Abderhalden*. Abt II, Teil 3, S. 3.097, 3306.
- DHÉRÉ (Ch.). — Physicochimie microbiologique. Sur la fluorescence de la pyocyanine synthétique. *Extrait comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. 198, p. 126, séance du 3 janv. 1934.
- DHÉRÉ (Ch.) et FONTAINE (M.). — Recherches spectrochimiques (Absorption et Fluorescence) sur la Bonelline, Pigment tegumentaire de la Bonellia viridis. *Travaux de l'Institut de Physiologie de Fribourg en Suisse*.

- DHÉRÉ (Ch.) et FONTAINE (M.). — Recherches sur la Fluorescence des algues et de leurs constituants pigmentaires. *Travaux de l'Institut de Physiologie de Fribourg en Suisse*, t. X, fasc. IX, 1931.
- DHÉRÉ (Ch.), GLUCKSMANN (S.) et RAPETTI (L.). — Sur les applications de la spectroscopie et de la spectrographie de Fluorescence en microbiologie. *Extrait comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, séance du 16 déc. 1933, t. CXIV, p. 1250.
- DONNAN. — *Z. Electrochem.*, t. 17, p. 572, 1911.
- DORIA TULLIO ROSSI. — Su di alcune specie di « Streptothrix » trovate nell'aria. *Annali dell' Istituto d'Igiene Sperimentale della R. Università di Roma*, vol. I, 1892.
- DOYEN (E.) et ROUSSEL (G.). — *Atlas de Microbiologie*, 1897, Ruef.
- DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, 1898.
- DUPAIX. — Contribution à l'étude de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix. *Trav. du Labor. de Microbiol. de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, fasc. III, 1930.
- DUPAIX. — *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix, 1930. Etude morphologique et biologique. Recherches sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger. Le François, Paris, 1933.
- DUPAIX. — Observations sur le pouvoir chromogène des Bactéries. *Trav. du Labor. de Microbiol. Facult. Pharm. de Nancy*, fasc. IV, 1931.
- DUPAIX. — Nomenclature. Place de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix dans la classification. *Bull. Assoc. Diplômés de Microbiol. Facult. Pharm. de Nancy*, n° 4, juin 1932.
- EISENBERG (J.). — Balteropmpgoscje Doagnostik Hilfstabellen zum gebrauch beim praktivchem. *Arbeiten*, 1891, 3° Auflage. Hamburg und Leipzig, L. Voss.
- EISENBERG. — Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien III Mitteilung. Weitere Untersuchungen über das Sporenbildungsvermögen bei Milzbraudbacillen. *Centralbl. f. Bakt.* I orig. Bd. 73, Heft 2 S. 81, 1914.
- EISENBERG. — IV. Mitteilung. Ueber den Variationskreis des *B. prodigiosus* und *B. violaceum*. *Centralbl. f. Bakt.* I Abt Orig. 73, Heft 7, 1914.
- ELEMA (B.). — *Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas*, t. 50, n° 7-8, p. 806, 1931.
- ERNST. — Ueber einen neuen Bacillus des blauer Eiters (*B. pyocyaneus*) eine Spielart des *Bac. pyocyaneus* der Autoren. *Seitschr. f. Hyg.*, Bd 2, p. 368, 1887.
- EWART (A.-J.). — On the evolution of oxygen from coloured Bacteria. *Journal of the Linnean Soc. Bot.*, 1897, p. 123.
- EWART (A.-J.). — Bacteria with assimilatory pigments found in the tropics. *Ann. Bot.*, II, p. 486.
- FALQUE (A.). — Pyocyanoides et réaction de l'antiprotéase. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 1921, p. 799.

- FERMI (Claudio). — Die mineral und organischen Sauren, die Alkali, die Alkaloïde, das Iodkali und das Arsensaurekali zur Differenzierung der Microorganismen. *C. f. Bakt.*, 1898, 23 Bd, p. 208.
- FERMI (Claudio). — Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversions ferments. *C. f. Bakt.*, 12 Bd, p. 713, 1892.
- FERMI (Claudio). — Contributo allo studio dei fermenti diastatici ed inversivi segregati dai microorganismi. *Annali dell' Istituto d'Igiene Sperimentale della R. Università di Roma*, vol. II, Nuova série, p. 117, 1892.
- FLUGGE (C.) — Les microorganismes. Trad. Henrijean A. Manceaux, B. janthinus, p. 255, 1887.
- FLUGGE. — Sur le bacillus coerules. *Centralbl. F. Bakt.*, II, p. 312, 1888.
- FLUGGE. — Die *Mikroorganismen*. I und II Reihe, 1896, Vogel, Leipzig, 3^e Auflage.
- FORSTER. — B. pavoninus.
- FRAENKEL (Carl). — Grundriss der Bakterienkunde. *Berlin Hirschwald*, 1887.
- FRAENKEL (Carl). — Die Einwirkung der Kohlen saure auf die Lebens-thaetigkeit der Mikroorganismen. *Zeit. F. Hyg.*, V Bd, 2 H, p. 332, 1889.
- FRANKLAND (Grace C.) et FRANKLAND (Percy F.). — Ueber einige typische Mikroorganismen im Wasser und im Boden. *Zeit F. Hyg.*, 1889, VI Bd, 3 H., p. 374.
- FRANKLAND (Percy) et FRANKLAND (M. R. S. Percy). — Microorganisms in Water, London, Longmans, Green and Co, 552 p., 1894.
- FRIEDHEIM (Ernst A.-H.). — La fonction respiratoire du Bacillus violaceus *C. R. Soc. Biol.*, II, 1932, p. 353.
- FROSCH et KOLLES. — In *Flugge* (36) die *Microorganismen*, 1896, II, p. 181.
- FULLES (Paul). — Bakteriologische Untersuchung des Bodens in der Umgebung von Freiburg. In *B. In. Dissert. philosop. Facultaet Veit et Com.*, 30 p. 1891.
- GACHTGENS. — Le bacille jasmino-cyaneus et flovo-aromaticus. *Centralbl. f. Bakt., Iena Orig.*, t. 38, p. 130, 1905.
- GAILLARD. — De l'influence de la lumière sur les Microorganismes, Lyon, 1888.
- GALCATTI (Gino). — Ricerche biologische sopra alcuni batteri chromogeni. *Lo Sperimentale*, vol. 46, fasc. 3, p. 261, 1892.
- GASPARINI (Gustavo). — Ricerche morfologiche e biologiche sul genere Actinomyces. *Hartz Annali delle Istituto d'Igiene Sperimentale della R. Università di Roma*. Nuova série, vol. II, p. 167, 1892.
- GASPARINI (Gustavo). — Ulteriori ricerche sul genere Actinomyces *Processi verbali della Soc. toscana di Sc. Naturali*, IX, mars 1894.
- GAUDUCHEAU. — Sur un bacille violet pathogène. *C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 278, 1907.
- GAUTHIER. — Recherches sur l'indol en Microbiologie. Thèse Pharmacie, Lyon, 1912.
- GERMANO (Ed.). — Der Membranaceus amethystinus mobilis. *C. F. Bakt.*, 1892, XII, Bd, p. 516.

- GESSARD. — Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique. *Ann. Inst. Past.*, t. III, p. 90, 1890.
- GESSARD. — Des races du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. V p. 65, 1891.
- GESSARD. — Fonctions et races du Bacille cyanogène. *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, p. 737, 1891.
- GESSARD. — Sur la fonction fluorescigène des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, p. 801, 1892.
- GESSARD. — Sur une propriété nouvelle du Bacille pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 50, p. 1033, 1893.
- GESSARD. — Variété mélanogène du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 15, p. 817, 1901.
- GESSARD. — Essai sur la biologie du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 16, p. 313, 1902.
- GESSARD. — Variété erythrogène du Bacille pyocyanique. *C. R. Acad. Sc.*, t. 165, p. 1071, 1917.
- GESSARD. — Classement des germes pyocyaniques par les pigments. *C. R. Soc. Biol.*, t. 82, p. 795, 1919.
- GESSARD. — Diagnostic pigmentaire du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 33, n° 4, p. 241, 1919.
- GESSARD. — Variété achromogène du Bacille pyocyanique. *C. R. Acad. Sciences*, t. 168, p. 1066, 1919.
- GESSARD. — Sur les bacilles pyocyanoïdes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 170. p. 298, 1920.
- GESSARD. — Sous-races des Bacilles pyocyanoïdes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 171, p. 414, 1920.
- GESSARD. — Technique d'identification des germes pyocyaniques. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 34, n° 2, p. 88, 1920.
- GESSARD. — Variétés de Bacilles pyocyanoïdes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 174, p. 1301, 1922.
- GESSARD. — Bacilles pyocyanoïdes de la variété mélanogène. *C. R. Acad. Sciences*, t. 180, p. 972, 1925.
- GUIGNARD et SAUVAGEAU. — Sur un nouveau microbe chromogène: le *Bacillus chlororaphis*. *C. R. Soc. Biol.*, déc. 1894.
- GUIGNARD. — Chromobactéries. *Traité de Médecine*, Charcot, Bouchard, Brissaud, t. I, p. 54, 1898.
- GUILLIERMOND. — Sur la présence de corpuscules meta-chromatiques dans les Bactéries. *Lyon-Médical*, 13 juillet 1902.
- GUILLIERMOND. — Contribution à l'étude cytologique des Bactéries. *C. R. Acad. Sc.*, 1906.
- GUILLIERMOND. — Contribution à l'étude histologique des Bactéries. *C. R. Acad. Sc.*, 1906.
- GUILLIERMOND. — La cytologie des Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 4, p. 748, 1907.
- GUILLIERMOND. — Sur l'origine des pigments anthocyaniques. *C. R. Acad. Sciences*, t. 161, p. 567, 1915.

- GAUTHIER. — Recherches sur l'indol en Microbiologie. Thèse Pharmacie, Lyon, 1912.
- GUNTHER. — Einführung in das Studium der Bakteriologie. 5^e Auflage, Leipzig, 1898.
- GUNTHER (C.) et SPITTA (O.). — Bericht über die Untersuchung der Berliner Leitungswassers in der zeit von April 1894 bis december 1897. *Archiv. für hyg.* 1899, 34 Bd, p. 101.
- GUTSTEIN. — La théorie de la coloration de Gram. *Centralbl. f. Bakt.*, Iéna, Orig. 93, p. 236, 1924.
- GUYOT (R.). — Bacilles chromogènes des eaux de fleur d'oranger. Morphologie. Milieux de culture. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, vol. 15, p. 12, 1917.
- HARRISSON (F.-C.) et BARLOW. — Sur un organisme chromogène nouveau producteur de la glaïre. *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt, Bd 15, p. 517, 1906.
- HAVEMANN. — Ueber das Wachstum von Mikroorganismen bei Eiss chranktemperatur. In *Dissert. Rostock*, 21 p., 1894.
- HEIM. — Lehrbuch der Bakteriologie. 2 Auflage, Stuttgart, 1890.
- HIRSCHFELD et ZAJDEL. — Sur la variabilité des Bactéries sous l'influence des conditions thermiques défavorables. *C. R. Soc. Biol.*, t. 90, p. 1104, 1924.
- HOTTINGER. — Contribution à la théorie de la coloration de Gram. *Centralbl. f. Bakt.*, Iéna, t. 26, p. 367, 1915.
- HUEPPE (F.). — Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, II Bd, p. 308, 1884.
- IMBEAUX (Ed.). — Les eaux potables et leur rôle hygiénique dans le département de Meurthe-et-Moselle. Thèse de Médecine, Nancy, 1897.
- ISABOLIASKY et SMOLJAN. — Sur l'action de quelques matières colorantes d'aniline sur les Bactéries. *Centralbl. f. Bakt.*, Iéna, t. 73, p. 427, 1914.
- ITZEROTT (G.) et NIEMANN. — Atlas microphotographique des Bactéries (Traduction fr. de S. Bernheim). Maloine, Paris, 1895.
- JIROU. — Sur les bacilles fluorescents et le Pyocyanique, de leurs fonctions chromogènes. *Journ. de Physiol. et de Pathol. Génér.*, p. 188, 1901.
- JOLLOS. — Variabilität und Vererbung bei Mikroorganismen. *Zeitschr. f. Indukt. Abstramm.*, p. 14, 1914.
- JOLLES (M. et A.). — Gutachen über behufs chemischen Bakteriöl. Untersuchung von Schuster im Arad eingesandtes, dem Badehausbrunnen im Arad Entnommenes Wasser. Charrin, *Traité de Médecine*, I, p. 30, 1891.
- JORDAN (M.) et EDWIN (O.). — Experimental investigations by the State Board of Health of Massachusetts. *Purification of Sewage*, p. 838, 1890.
- JORDAN (M.) et EDWIN (O.). — Le Bacille pyocyanique et ses pigments. *Journ. of Experimental Medecine*, New-York, p. 627, 1899.

- KERN (O.). — Die Riselfelder der Stadt Freiburg, I, B., *Archiv. f. Hyg.*, 32 Bd, p. 173, 1898.
- KIRCHENSTEIN. — Morphologie, développement et signification des formes bactériennes dégénérées. *Acta. Microbiol. Universitatis Laviensis*, n° 2, p. 142.
- KIRCHENSTEIN. — Sur le morphologisme et le développement des formes atypiques des Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 716, 1923.
- KLADAKIS. — Ueber Einwirkung des Leuchtgases auf die Lebensthätigkeit der Microorganismen. *Inaug., Dissert.*, Berlin, 28 p., 1890.
- KOGL et POSTOWSKY. — Ueber das grüne Stoffwechsel product des Bacillus chlororaphis. *Liebigs. Ann. der Chemie*, Bd. 480, Heft 2 et 3, p. 280, 1930.
- KRAAL. — Bacteriologisches Laboratorium. *Prag. Sammlung*, october 1899.
- KRUSTE. — In Flugge (36). Die Mikroorganismen, 1896, II.
- KUETZING. — *Species Algarum*, p. 472 et *Tabul. phyc.*, V.
- KUNSTLER et BUSQUET. — Sur la valeur nucléaire du corps central des Bactériacées. *C. R. Acad. Sciences*, t. 125, 1897.
- KUNSTLER et BUSQUET. — Observations sur la structure des bactériacées et des organismes voisins, Bordeaux, 1897.
- LACHNER-SANDOVAL (V.). — Ueber Strahlenpilze Strassburg. Ludolf Beust, 75, 1898.
- LAFAR (F.). — *Technische mykologie*, I Bd, 1897.
- LAGERHEIM (G.). — Las Bacterias vilades. Quit, 1891.
- LASSEUR. — Le Bacillus chlororaphis et la chlororaphine. *C. R. Soc. Biol.*, t. 66, n° 6, p. 272, 1909.
- LASSEUR. — Contribution à l'étude du Bacillus chlororaphis G. et S. *Thèse Sciences naturelles*, Nancy, 1911.
- LASSEUR. — Le Bacillus chlororaphis, influence du fer sur la production de la chlororaphine. *C. R. Soc. Biol.*, t. 70, p. 154.
- LASSEUR. — Les milieux synthétiques. Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de certaines Bactéries. *Soc. Sciences*, Nancy, séance du 1^{er} février 1913.
- LASSEUR. — Observations sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries (*Recueil publié à l'occasion du Jubilé scientifique du professeur G. Le Monnier*, nov. 1913, p. 99).
- LASSEUR. — Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. 24, p. 496.
- LASSEUR. — I. Sur l'extraction des pigments microbiens. II. Sur l'analyse capillaire des corps colorés microbiens. *C. R. Soc. Biol.*, t. 76, p. 819, mai 1914.
- LASSEUR et GIRARDET. — L'eau pure en Biologie. *Bull. de la Soc. de Chimie Biologie*, t. 6, n° 4, p. 314, avril 1922.
- LASSEUR et VERNIER. — Contribution à l'étude de Bacillus le Monnieri Lasseur. *Tr. du Lab. de Microb. Facult. Pharm.*, Nancy, 1925.

- LASSEUR et NOBLAT. — Conductibilité des suspensions bactériennes. *Ibid.*, 1928, fasc. I.
- LASSEUR et NOBLAT. — Agglutination des Bactéries chauffées à 80° C. *Ibid.*, p. 63.
- LASSEUR et JOUFFROY. — Agglutination de *B. pyocyaneus* Gessard. *Ibid.*, p. 115.
- LASSEUR, THIRY et DUPAIX. — Le fer dans la vie microbienne. Aperçu historique. Influence du fer sur la coloration des cultures de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix. *Ibid.*, 1930, fasc. III, p. 53.
- LASSEUR, THIRY, DUPAIX et OLIVIER. — Influence du phosphore et du magnésium sur la fonction fluorescigène de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix. *Ibid.*, p. 33.
- LASSEUR, OLIVIER, DUPAIX et MAGUITOT. — Relation entre le pH des milieux de culture et le pouvoir chromogène de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix. *Ibid.*, p. 67.
- LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX. — Modifications temporaires, modifications durables observées chez les Bactéries. *Ibid.*, p. 105.
- LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX. — Relation entre la concentration en ions hydrogène des milieux de culture, la végétation et la chromogénèse bactérienne. *Ibid.*, fasc. IV, p. 13, 1931.
- LASSEUR, COMTE et DUPAIX. — Influence du fer sur la production de la prodigiosine. *Ibid.*, p. 31.
- LASSEUR, DUPAIX et MARCHAL. — Étude du pouvoir protéolytique de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix et *B. pyocyaneus* Gessard dans les milieux de pH croissants. *Ibid.*, p. 63.
- LASSEUR, DUPAIX et DOMBRAY. — Étude sur le mécanisme de la précipitation des suspensions de *B. prodigiosus* par les ions H. (phénomène de Malvoz-Michaelis). *Ibid.*, p. 211.
- LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et MARCHAL. — Observations sur la vie de *B. caryocyaneus* Beijerinck-Dupaix en milieu lithiné. *C. R. Acad. Sciences*, t. 194, n° 18, p. 1606, 1932.
- LASSEUR, DUPAIX et GEORGES. — Action des ions H sur les suspensions microbiennes. *Tr. Labor. Microb. Fac. Pharm.*, Nancy, fasc. V, 1932, p. 105.
- LASSEUR, MARCHAL, DUPAIX et RENAUX. — Observations sur la chromogénèse de *B. cyaneofluorescens* Zangemeister, 1895. *Ibid.*, p. 111.
- LASSEUR, FRIBOURG et GROSJEAN. — Cultures de quelques Bactéries chromogènes en milieux synthétiques additionnés d'indicateurs. *Ibid.*, p. 125.
- LEUHMANN et NEUMANN. — Atlas und Grundriss der Bakteriologie, 2^e édition, 1899.
- LEMBKE (W.) — Beitrag zur Bakterienflora des Darms. *Archiv. f. Hyg.*, Bd 26, p. 293, 1896.
- LIOT (A.). — Culture du Bacille pyocyanique sur milieux chimiquement définis. *Bull. des Sc. Pharmacol.*, p. 193, 1927.

- LINCOLN. — L'agglutination dans le groupe des Bactéries fluorescentes. *The Journal of Infections Diseases Chicago*, p. 268, 1904.
- LOEFFER (F), OESTEN (G.) et SENDTNER (R.). — Wasserversorgung, Wasserversorgung und Wasserbeurtheilung. *Handbuch der Hygiene her von th. Weyl* 24 Lief, I Bd, II Abt, 1896, Rischer.
- LUNT (J.). — On *B. mesentericus niger*. A. New Potatoe Bacillus. *C. F. Bakt*, II Bd, p. 572, 1896.
- LUSTIG (A.). — Diagnostik der Bakterien des Wassers, 2 Auflage. Uebersetzt von R. Teuscher 1893, Iéna, Fischer, 128 p.
- LUSTIG (A.). — Diagnostica dei Batteri delle acque. 1890, Rosenberg et Sellier, Torino, 122 p.
- MACÉ (E.). — Sur quelques Bactéries des eaux de boisson. *Ann. d'Hyg. Publique et de Méd. légale*, t. 17, n° 4, p. 354, 1887.
- MACÉ (E.). — L'analyse bactériologique de l'eau. *Ann. d'Hyg. publique et de Méd. légale*, t. 19, juin 1888, p. 501.
- MACÉ (E.). — Sur la présence du Bacille typhique dans le sol. *C. R. Acad. Sc., Paris*, 28 mai 1888.
- MACÉ (E.). — Sur la récupération de la vitalité des cultures de Bactéries par passages sur certains milieux. *Bull. Soc. Sc. Nancy*, 1888, 28 juin.
- MACÉ (E.). — *Traité pratique de Bactériologie*, 1887, 3^e édition, Baillière.
- MACÉ. — *Traité pratique de Bactériologie*, 1901, 4^e édition, Baillière.
- MACÉ. — Atlas de Microbiologie, 1898, Baillière, 3 fasc.
- MAMELLE. — Contribution à l'étude du *B. pyocyaneus erythrogenes* Gessard. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1919.
- MARCHAL (E.). — Sur la production d'ammoniaque dans le sol par les microbes. *Ann. Soc. Belge de Microscopie*, 2 fasc., 1893.
- MARCHAL (J.-G.). — Culture pure en Bactériologie. *Bull. Ass. Diplômés Microb. Fac. Pharm. Nancy*, n° 1, 1931.
- MARCHAL (J.-G.). — Variation et mutation en Bactériologie. Le François, Paris, 1932.
- MARCHAL (J.-G.). — Réaction de Gram. Facteurs influençant la durée de décoloration. *Bull. Assoc. Anciens Etudiants Faculté Pharm. de Nancy* n° 19, 1933.
- MARPMANN (G.). — Ueber blaue Hefen. *Zeit. f. Angewandte Mikroskopie*, 1896, II Bd., 1 H., p. 9.
- MARSHALL WARD. — A violet Bacillus of the Thames. *Ann. of Bot. I*, p. 59, 1898.
- MASCHEK. — Bakteriologische Untersuchungen der Leitmeritzer Trinkwasser. Jahresbericht der Komm. Aber Réalschule zu Leitmeritz. Böhmen, 1887.
- MATRUCHOT (L.). — Sur une méthode de coloration du protoplasme par les pigments bactériens. *C. R. Acad. Sciences*, Paris, 21 nov. 1898, p. 830.
- MATRUCHOT (L.). — Sur une méthode de coloration du protoplasma par les pigments des champignons. *C. R. Acad. Sciences*, Paris, 28 nov. 1898, t. 127, p. 881.

- MATRUCHOT (L.). — Sur une structure particulière du protoplasma chez une mucorinée et sur une propriété générale des pigments bactériens et fongiques. *Rev. Génér. de Bot.*, 1900, t. 12, p. 33.
- MERCIER (L.) et LASSEUR (Ph.). — Variation expérimentale du pouvoir chromogène d'une Bactérie (*Bacillus chlororaphis*). *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, 22 mai 1911, p. 1415.
- METCENNIKOFF. — Note sur le pléomorphisme des Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 3, p. 61, 1889.
- MIGULA. — System des Bakterien. Fischer, G., I Bd., 18997, 368 p.; p. 90, II Bd., 1900, 1068 p.
- MIGULA. — *Pseudomonas pseudoviolacea*. System der Bakterien, vol. II, p. 943.
- MINOUX. — La forme des Bactéries. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1927.
- MIYOSKI (M.). — Studien über die Schwefelbräsenbildung und die Schwefelbakterien der Thermen von Jumoto bei Nikko. Reprinted fr. *The Journ. of sc. Imperial university Tokyo*, Japon, 1897, col. 10 et 11, p. 143.
- MORRIS (Max). — Studien über Production von Schefelwasserstoff, Indol, und Merkaptan bei Bakterien. *Arch. f. Hyg.*, 1897, 30 Bd., p. 304.
- MUELLER (F.). — Ueber reduzierende Eigenschaften von Bakterien. *C. F. bakt.*, 1889, 26 Bd., p. 51.
- MULLET. — De l'adaptation de certaines Bactéries banales à des optima thermiques anormaux. *C. R. Soc. Biol.*, p. 639, 1928.
- NADSON et PHILIPPON. — Influence des rayons X sur la sexualité et la formation des mutantes chez les champignons inférieurs (mucorinées). *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, p. 473, 1925.
- NEKAM (At.) et ATJAY. — *B. violaceus diffusus*.
- NEPVEUX. — Une nouvelle espèce chromogène des eaux: *Bacillus Bruntzii*. Nepveux. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1920.
- NEPVEUX. — Influence du fer sur le pouvoir chromogène de *B. Bruntzii*. *C. R. Soc. Biol.*, mai 1920.
- NICOLLE. — Pratique des colorations microbiennes. Méthode de Gram modifiée et méthode directe. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 9, 1895.
- NICOLLE et ZIA BEY. — Note sur les fonctions pigmentaires du Bacille pyocyanique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 10, p. 669. 1896.
- PAMMEL (L.-H.) et COMBS (Rob.). — Some notes on chromogenic bacteria. *Botanical Dept. Iowa Agricult. Coll. From. Proc. Iowa Acad. of. Sc.*, vol. III, p. 135.
- PANSINI (Sergio). — Dell' azione della luce solare sui microorganismi. *Revista Igiene*, 1889.
- PASTEUR. — Etude sur la bière. Gauthier Villars, Paris, 1876.
- PEJU et RAJAT. — Variations morphologiques des Bacilles dans les milieux salins. *Lyon Médical*, t. 106, n° 259, 1906.

- PEJU et RAJAT. — Variations chromogènes du *Micrococcus prodigiosus* dans dans les milieux alcalins. *C. R. Soc. Biol.*, p. 759, 1907.
- PETIT. — Contribution à l'étude cytologique et toxinomique des Bactéries. *Thèse Sciences*, Paris, 1927.
- PFEFFER (Wilh.). — Ueber die Bildung von Sauerstoff in gewissen Bakterien. *Berichte über d. Verhandl. der Kgl. sächsischen ges. d. Wissensch.*, Leipzig; *Mathem. physicol. Klasse*, p. 379, 1896.
- PLAGGE und BERNHARD PROSKAUER. — Bericht über die Untersuchung des Berliner Leitungswassers in der Zeit vom. 1. Juli 1885 bis. E. April 1886. *Zeit. f. Hyg.*, 1887, II Br., 3, 401.
- POKROWSKY (M.-A.). — Mikroorganismen aus dem wasser der Kura Flusses und der Tifliser Wasserleitung im zeitraum von Februar bis Mai 1891. *Protokolle der Kaukasisch medic. Gesselsch.*, 1891, n° 4, p. 61.
- PONCET (F.). — Les microbes des eaux minérales de Vichy. 1895. Baillière.
- PRIBRAM (E.) et PULAY (E.). — Contributions à la systématique des microbes I. Le groupe des *Bactérium fluorescens*. *Centrabl. f. Bakt.*, Iena, I Abt, p. 321, 1915.
- RABENHORST. — *Flora Europaeae Algarum* II, p. 57.
- RADAIS. — Sur une nouvelle race du bacille pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 49, p. 808, 1897.
- RAULIE. — Etudes chimiques sur la végétation. Recherche sur le développement d'une Mucedinée dans un milieu artificiel. *Ann. Sc. Natur. Botan.*, 1870.
- RAY-LANKASTER. — Further observations on a peachor red-colourels bacterium. *Bacterium Rubescens*. *Quart. 5 Micr. Sc.*, London, n° 3.16, p. 27, 1876.
- REINER MULLER. — Some new. bacteriological discoveries inheritance of acquired characters in Bacteria. *Scient. Ann. Suppl.* N. Y., 1999.
- RICHEL et CARDOT. — Hérité et accoutumance et variabilité dans le ferment lactique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 33, p. 575, 1919.
- RIPPEL. — Variabilität bei Bakterien. *Med. Klin Wochenschrift. f. praktische Artze*, 24, 1929.
- ROCHAIX et BANSILLON. — Sur la régénération de la fonction pigmentaire du bacille pyocyanique par son passage sur milieux sucrés. *C. R. Soc. Biol.*, t. 89, p. 538, 1923.
- ROCHAIX, TAPERNOUX et COUTURE. — Œufs et Bacille pyocyanique. *Bull. de la Soc. Vétérinaire de Lyon*, t. 36, p. 205. 1933.
- ROLIN. — La forme des Bactéries. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1929.
- RONCALI (D.-B.). — Sull'azione reciproca de prodotti solubili del *B. tuberculosis* e di altri microorganismi patogeni e non patogeni. *Ann. del Ist. d'Ig. Sp. della r. Univ. di Roma*, 1892. vol. II, nuava série, p. 87.
- RONCALI (D.-B.). — Dell'azione del veleno del *B. tetani* coi prodoti di cultura di alcuni microorganismi patogeni. *Ibid.*, 1893, vol. III, nuava série. p. 117.

- ROSENBERG (Bernhard). — Ueber die Bakterien des Mains-wassers. *Archiv. f. Hyg.*, 1886, V. Bd., p. 446.
- ROSENBERG (Wulf-Wladimir). Beiträge zur Kenntniss der bakterien farbstoffe insbesondere der Gruppe der Bakterien prodigiosum. *In Diss. Med. Fak., Würzburg*, 1889.
- ROUX (G.). — Précis d'analyse microbiologique des eaux. 1892, Baillière.
- SABOURAUD (R.). — Diagnostic et traitement de la pelade et des teignes de l'enfant. Ruef et Cie, p. 202, 1895.
- SABOURAUD. — Les trichophyties humaines. — *Texte et Atlas* Ruef et Cie, p. 189, 1894.
- SANFELICE (Francesco). Delle modificazioni presentano alcuni batteri aerobi obligati e facoltativi coltivati in assenza dell' ossigeno. *Ann. dell'Ist. d'Ig. Sp. della r. Univ. Roma*, vol. III. nuova serie, p. 345, 1892.
- SAUVAGEAU et RADAIS. — Sur les genres Cladothrix Spretothrix Actomyces et description de deux Streptothrix nouveaux. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 6, p. 242, 1892.
- SCHLUETER. — Das Wachstum der Bakterien auf sauren Naehrboden. *C. F. Bakt.*, XI Bd., p. 589, 1892.
- SCHNEIDER (Paul). — Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Unterscheidung der Arten. *In Dissert. Philosoph. Facultä.*, Basel, 1894.
- SCHNEIDER (Paul). — (Klein und Migula, Friedlander). *Arbeiten aus dem Bacteriologischen Institut der Techn. Hochschule von Karlsruhe*, 1895, h. 2, 30 p.
- SCHOLL. — Contribution à la connaissance de la décomposition du lait par les microbes. *Fortschritte der Medizin*, Band VII, 1889, p. 801.
- SCHRÖTTER (J.). — Ueber einige durch Bakterieng gebildete Pigmente. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen hrsg. von F. Cohn* 1872, I Bd., 2 h., p. 109.
- SCHRÖTTER (J.). — Kriptogamentflora von Schlesien. Pilze, 1886, p. 145.
- SCHRÖTTER (J.). — Die Pilz Schlesien. Cohn Kriptogamen Flora von Schlesien, 1889, III Bd.
- SEIXAS PALMA (José de). — La matière colorante chez le Bacille pyocyanique *Centralbl. f. Bak. Iena*, 1907, vol. 43, p. 417.
- SEPILLI. — Contributi allo studio dei pigmenti batterici. Nota II: Influenza del calcio sulla produzione dei pigmenti batterici. *Boll. dell. Ist. Sieroterapico Milanese*, fasc. 7, Luglio, 1931.
- SERRA. — Pouvoir bactéricide des matières colorantes dérivées du triphénylméthane. *Thèse Sciences*, Nancy, 1932.
- SLENN (Van der). — Note sur l'examen bactériologique qualitatif de l'eau. Haarlem Heritiers Loosjes. 1894, *Arch. Teyler*, Série II, t. IV, 8 partie, p. 121.
- SMITH ALLEN (J.). — A new chromogenic Bacillus (B. cœruleus). *Medical News*, vol. II, n° 27, p. 758, 1887.
- STAGNITTA BALISTRERI (F.). — Die Verbreitung der Schwefelwasserstoffbildung unter den Bakterien. *Arch. f. Hyg.*, 16 Bd., p. 10.
- STENGLEIM (M.). — Blaue Hefe. *Koch's Jahreshb.*, 1896, p. 85, n° 292.

- STERNBERG (G.-M.). — A text-Book of Bacteriology; 1897, *London Churchill*.
- SULLIVAN (M.-X.). — Synthetic culture media and the Biochemistry of Bacterial pigments. *Journ. of medical Reserch.*, 1905, v. 14, p. 109.
- TAGER (G.). — Bakteriologische Untersuchungen der Grundwasser in Jurfew nebst Studien über das Verhalten einiger Saprophyten im Wasser. *In. Dissert. Jurfew.*, 1893, 56 p.
- THIRY (G.). — Sur une Bactérie produisant plusieurs couleurs (B. polychrome). *C. R. Séance de Soc. Biol.*, 7 nov. 1896.
- THIRY (G.). — Contribution à l'étude du polychromisme bactérien Bacille et Cladothriz polychromes. Cristaux colorés. *Arch. de Physiol.*, avril 1897, n° 2, p. 284.
- THIRY (G.). — Contribution à l'étude du polychromisme bactérien. *Arch. de Physiol.*, t. 9, p. 284, 1897.
- THIRY (G.). — Bacille polychrome et Actomyces mordoré. *Thèse de Médecine*, Nancy, 1900.
- THOMAS. — Etude comparative de Bacillus Mesentericus fuscus Flugge et de Bacillus mesentericus Niger Lunt. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1930.
- THUMM (Karl). — Beiträge zur Biologie der fluorescierenden Bakterien. *In. Dissert. philosoph. Fakultät*, Basel, 1895, A. Dœlter.
- TIEMANN (Ferd.) et GAERTNER (Aug.). — Die chemische und mikroskopisch-bakteriologische Untersuchung des Wassers. 3 Auflage, 1889. Vieweg und Sohn, Braunschweig.
- TIEMANN (Ferd.) et GAERTNER (Aug.). — 4 Auflage, 1895.
- TILS (Joseph). — Bacteriologische Untersuchung der Freiburger Leitungswasser. *Inaug. Dissert. philosoph. Fakultät.*, Freiburg, 1890.
- TONI (J.-B.) et TREVISAN (V.). — Sylloge Schizomycetum ex Saccardo Sulloge Fung, vol. 8, p. 923, Patavii, décembre 1889.
- TRELEASE. — Observations on several zoologae and related forms. *Johns Hopkins Univ. Stud. f. T. Biol. Labor.*, vol. III, n° 4, Baltimore, 1885.
- VAN TIEGHEM. — Observations sur les Bactériacées vertes. *Bull. Soc. Bot.*, p. 174, 1880.
- VINCENT. — Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 12, p. 785, 1898.
- VIROU (L.). — Sur quelques matières colorantes solubles produites par des Bactériacées, des eaux distillées médicinales. *C. R. Acad. Sciences*, t. 114, p. 179, 1892.
- VOGES. — Sur le bacillus indigoferus. *Centralbl. f. Bakt.*, 14,* p. 307, 1893.
- VOGES. — Ueber einige im Wasser vor Kollende Pigment Bakterien. *C. F. Bakt.*, 1893, 14 Bd., p. 301.
- WARD (H.-M.). — A violet bacillus from the thomes. *Ann. of Botany*, 1898, March, vol. 12, n° 45, p. 59.
- WARD (H.-M.). — Somes Thomes Bacteria. *Ann. of Botany*, 1898, vol. 12, n° 47, p. 287.

- WARMING (Eug.). — Om nogle ved Danmarks kyster levende Bakterier in Videnskabelige Meddelelser fra den naturhist. Forening i Kjøbenhavn, 1875, p. 398.
- WASSERZUG. — Variations durables de la forme et de la fonction chez les Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, t. II, p. 154, 1888.
- WINOGRADSKY. — Ueber Schwefelbakterien. *Bot. Zeit.*, 1887. ,
- WINOGRADSKY. — Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien II-I, zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien, 1888, Leipzig, A. Felix, 120 p.
- WINOGRADSKY. — Sur le polymorphisme des Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, t. III, p. 242, 1889.
- WINTER (Georg.). — L. Rabenhorst's Kryptogamen. *Flora von Deutschland, Oesterreichs und der Schweiz*. I Bd., Pilze I, Abt., 1884, Leipzig, E. Krummer.
- WITTLIN (Jacob.). — Des bactéries suceptibles de se développer lorsqu'on emploie la méthode de Parietti pour l'analyse bactériologique de l'eau. *Ann. de Micrographie*, 1896, t. 8, p. 89.
- WREDE et HETTCHÉ. — Ueber das Prodigiosin den roten Farbstoff des *Bacillus Prodigiosus*. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft Verlag*, p. 2678, 1929.
- WREDE et STRACK. — Zur Synthese des pyocyaneus und einiger seiner homologen. *Berichte der deutschen chemischen Gesel. Verlag*, Berlin, 62, 1929, Heft 8, S. 2051.
- WREDE. — Sur la pyocyanine, le colorant bleu du *B. pyocyaneus*. *Zeit. f. Hyg. Infekt.*, Berlin, Verlag von Julius Springer, 1930, Bd., I, Heft, p. 89.
- WOLFF. — Observations sur un oidium du lait bleu, sur *Bacterium syncyanum* et *bacterium cyaneo-fluorescens*. *Centralbl. f. Bakt.*, Iena, 1913, II Abt., t. 38, p. 289.
- WURMSER. — Oxydations et réductions. *Les Presses Universitaires de France*, Paris, 1930.
- ZANGEMEISTER (Von Wilh.). — Kurze Mitteilungen über Bakterien der blauer Milch. *Centralblt. f. Bakt. und Parasitenkunde*, Bd. XVIII, p. 321, 1895.
- ZETTNOW. — Romanowski's Färbung bei Bakterien. *Feit. F. Hyg.*, 1899, 30 Bd., p. 1-19.
- ZIMMERMANN (O.-E.-R.). — Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwasser insbesondere des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung. Carl Brunner. Chemnitz, I, 1890, 106 p., et II, 1894, 92 p.
- ZIERKENDÖRFER (C.). — Ueber die im Hühnerei vorkommenden Bakterienarten nebst Vorschlägen zu rationellem Verfahren der Eikonservierung. *Archiv. f. Hyg.*, 18, 14 Bd., 4, p. 369, 1893.
- ZOPF. — Die Spalpilze 1885. Breslau, E. Trewendt, *Bakterium Janthinum* Zopf, p. 68.
-

BACILLUS CARYOCYANEUS Beijerinck



Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

(Extrait du Fascicule III 1930 des Travaux du
Laboratoire de Microbiologie.)

BACILLUS LE MONNIERI Lasseur

Planche IV



Photogravure Berger-Levrault — Nancy-Paris.

R. LIENHART del. et pinx.

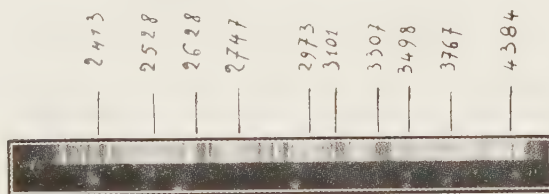
Extrait de: Contribution à l'étude de *Bacillus Le Monnier* LASSEUR, in *Bulletin de la Soc. des Sc. de Nancy*, série IV, tome II, fascicule II, juillet 1923-mai 1924.

SPECTOGRAMMES

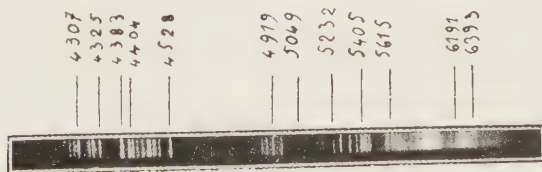
Les planches ci-après ont été extraites de « *Contribution à l'Etude des Pigments microbiens* », par LASSEUR et GIRARDET (1926).

Etant des reproductions elles ne présentent pas la netteté des originaux mais n'en donnent pas moins la documentation complémentaire nécessaire que nous voulions apporter à notre ouvrage.

Spectrogramme N° 1. — Spectre du fer obtenu avec le spectrographe d'HILGER. Quelques raies ont été reprérées d'après l'atlas de FABRY et BUISSON.



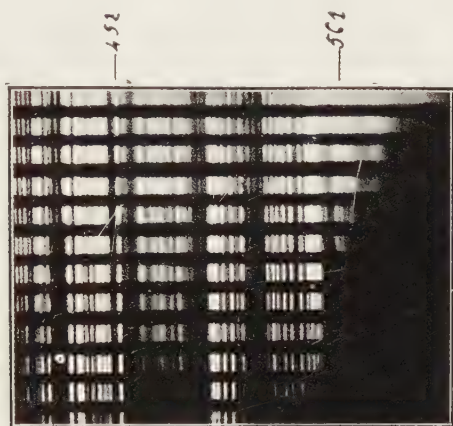
Spectrogramme N° 2. — Spectre du fer obtenu avec le spectroscopie de PAASCHEN construit par FUESS. Raies reprérées d'après l'atlas d'EDER et VALENTA.



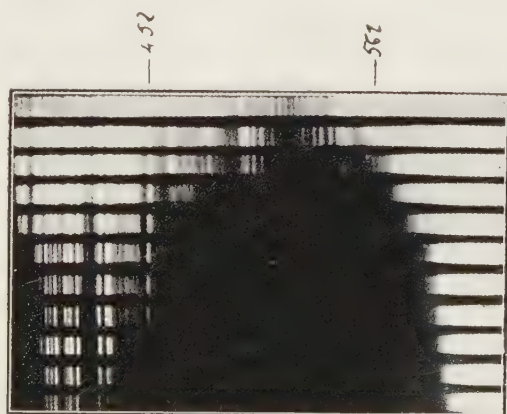
D'après LASSEUR.

Spectres de la pyocyanine

Spectrogramme N° 3. — Spectre visible. Solution alcoolique de pyocyanine additionnée de NH_3 . Concentration: 0 gr. 120 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.

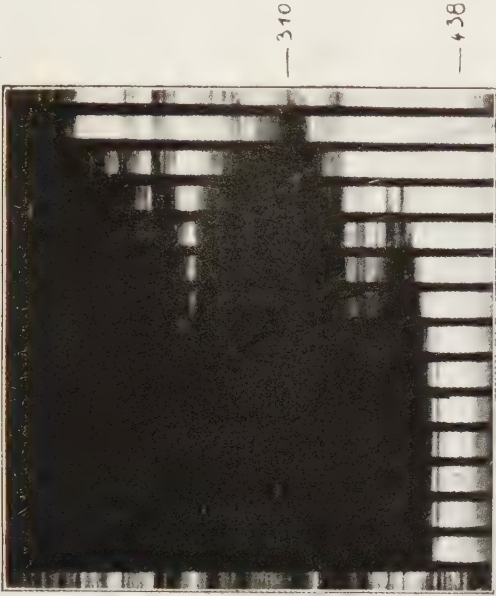


Spectrogramme N° 4. — Spectre visible. Solution alcoolique de chlorhydrate de pyocyanine additionnée d' HCl . Concentration: 0 gr. 120 de chlorhydrate de pyocyanine par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.



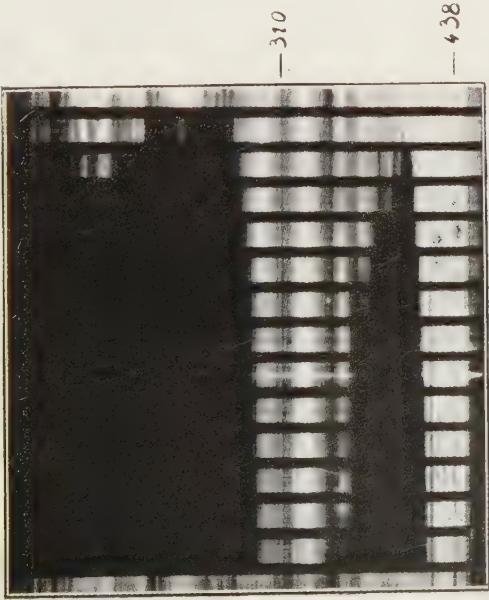
D'après LASSEUR.

Spectrogramme N° 5. — U. V. Solution aqueuse N/10.000 de chlorhydrate de pyocyanine additionnée de NH^3



D'après GROSS.

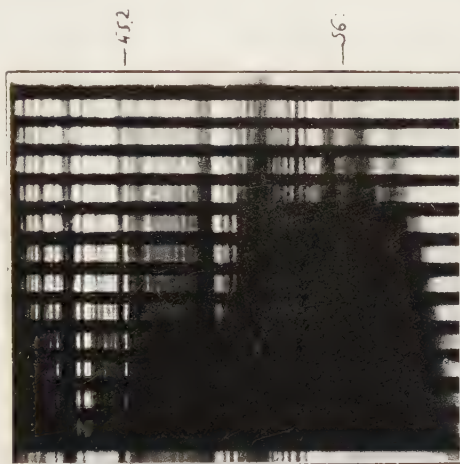
Spectrogramme N° 6. — U. V. Solution aqueuse N/10.000 de chlorhydrate de pyocyanine additionnée de HCl .



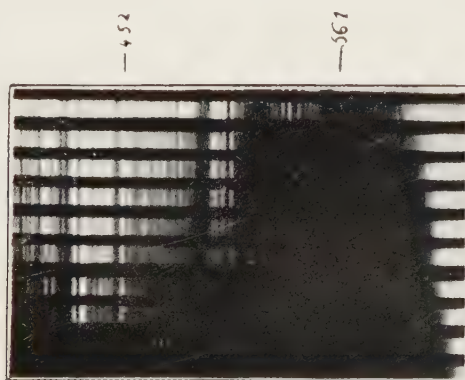
D'après LASSEUR.

Spectres du Pigment Violet

Spectrogramme. N° 7. — Spectre visible. Solution alcoolique de pigment violet. Concentration : 0 gr. 026 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.

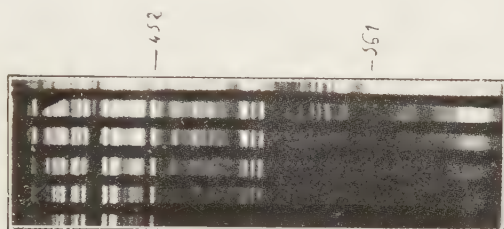


Spectrogramme N° 8. — Spectre visible. Solution alcoolique de pigment violet. Concentration : 0 gr. 013 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.

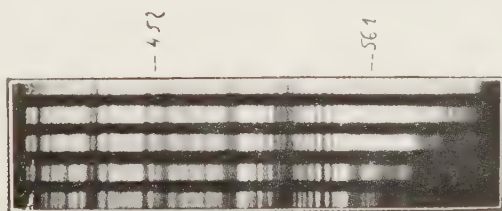


D'après LASSEUR.

Spectrogramme N° 0. — Spectre visible. Solution alcoolique de pigment violet. Concentration: 0 gr. 026 par litre. La solution est additionnée de 4 cm³ d'acide sulfurique pur du commerce par 100 cm³ d'alcool. $E_1 = 10$; $E_2 = 15$.

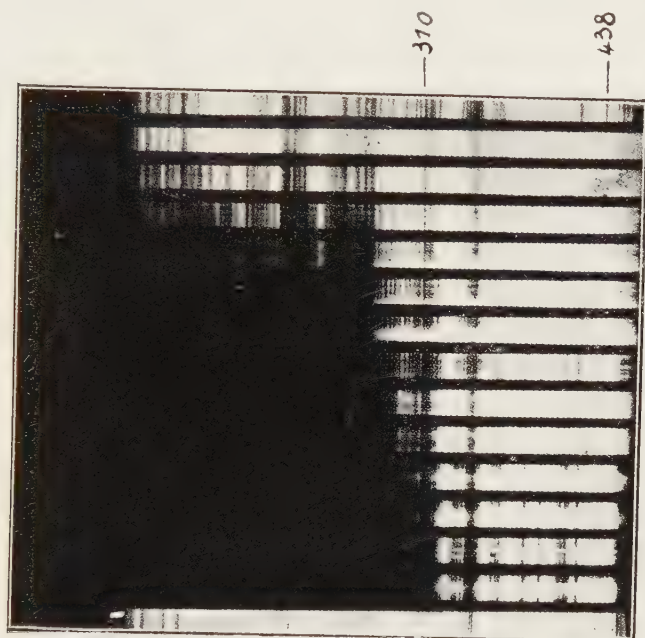


Spectrogramme N° 10 — Spectre visible. Solution alcoolique de pigment violet. Concentration: 0 gr. 026 par litre la solution est additionnée de 6 cm³ d'acide sulfurique par 100 cm³ de solvant.



D'après LASSEUR

Spectrogramme N° II. — U. V. Solution alcoolique de pigment violet additionnée d'acide sulfurique. Concentration: 0 gr. 040 par litre.

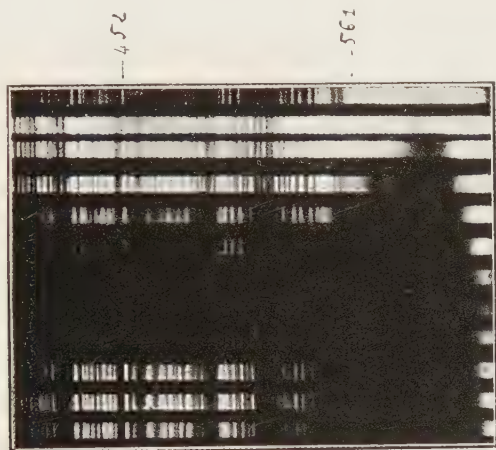


D'après LASSEUR-GROSS.

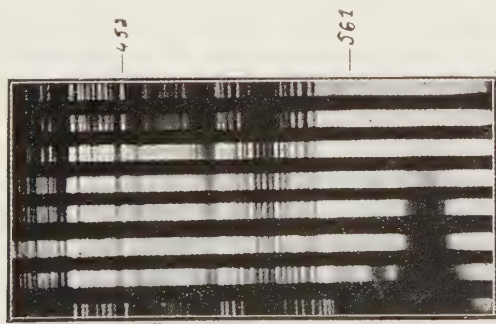


Spectres du Pigment secrété par B. le Monieri

Spectrogramme N° 12. — Spectre visible. Solution pyridinique du pigment de *B. Le Monnieri*. Concentration: 0 gr. 187 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.

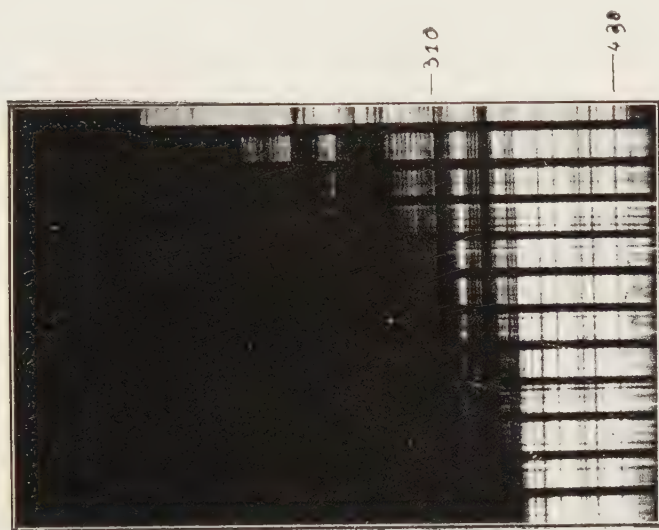


Spectrogramme N° 13. — Spectre visible. Solution pyridinique du pigment de *B. Le Monnieri*. Concentration: 0 gr. 054 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.



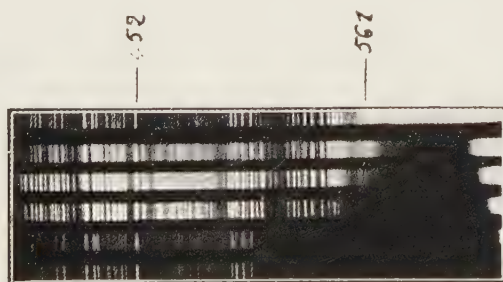
D'après LASSEUR-GROSS

Spectrogramme N° 14. — U. V. Solution du pigment de *B. Le Monnier*. La matière colorante est dissoute dans le mélange acide acétique (80 parties) + chloroforme (20 parties). Concentration : 0 gr. 020 par litre.



D'après LASSEUR-GROSS.

Spectrogramme N° 15. — Spectre visible. Solution pyridinique du pigment de *B. Le Monnier*. Concentration : 0 gr. 435 par litre. $E_1 = 5$; $E_2 = 10$.



D'après LASSEUR.



SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
2, Rue René-d'Anjou, 2
NANCY

